



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MONITORIZACIÓN DEL ADN TUMORAL CIRCULANTE EN ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS AVANZADO

Tesis Doctoral presentada por:
María del Sol Huerta Álvaro

Directores de Tesis:
Prof. Andrés Cervantes Ruipérez
Dr. Luís Sabater Ortí
Dra. Noelia Tarazona Llaveró

**Facultat de Medicina i
Odontologia**

Programa 3139
Departament de Medicina



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia
Programa 3139 Departament de Medicina

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MONITORIZACIÓN
DEL ADN TUMORAL CIRCULANTE EN ADENOCARCINOMA
DE PÁNCREAS AVANZADO**

Tesis Doctoral presentada por:
María del Sol Huerta Álvaro

Directores de Tesis:
Prof. Andrés Cervantes Ruipérez
Dr. Luís Sabater Ortí
Dra. Noelia Tarazona Llaveró

Enero, 2024

Esta tesis se ha podido desarrollar gracias a la financiación obtenida, fundamentalmente, de la Ayuda a la Investigación en Salud de la Fundación Mutua Madrileña de 2019 (expediente AP1716522019) y de donaciones de pacientes y asociaciones a INCLIVA para la investigación en cáncer de páncreas.

Desde estas líneas, me gustaría poder reflejar todo lo agradecida que estoy a aquellas personas que, de uno u otro modo, han hecho posible esta tesis.

A mis directores de tesis, tres grandes profesionales y, sobre todo, grandes personas. A Andrés, por guiarme desde el primer momento en el que empecé mi formación y enseñarme, desde el ejemplo, la importancia de equilibrar el interés por el enriquecimiento intelectual con la atención y cercanía al paciente. Gracias por estimularme para seguir mejorando, por confiar en mí y estar cerca en momentos difíciles. A Luís, por tu ayuda, confianza y apoyo siempre, por tus consejos para la tesis y en el día a día del hospital, por crear ese grupo con el que es tan fácil trabajar. A Noelia, mi Dra. Tarazona, la persona que podría aparecer en todos los párrafos de los agradecimientos porque tengo la gran suerte de tenerte “más allá del trabajo”. Desde el día siguiente de elegir especialidad, en contacto permanente y, desde poco después, eres compañera, ejemplo a seguir, amiga, familia.... simplemente gracias por estar. Tengo claro que sin ti no hubiera podido desarrollar esta tesis.

A Ana Lluch, por todo lo que me has enseñado, por tu inmenso cariño y cercanía. Por ser un gran ejemplo y, siendo mujer y “de pueblo”, demostrar que con trabajo, constancia e ilusión se pueden romper techos de cristal.

Al Servicio de Oncología (médicos, enfermeras, auxiliares...), por acogerme de forma excepcional, porque ir a trabajar a gusto es muy importante y me siento afortunada de poder hacerlo. Gracias por vuestras enseñanzas, compañerismo y afecto. No me puedo extender en cada uno, porque no acabaría, aunque haré mención especial al “GI Team” y “OMG”, que son los que más me sufren...y a Valentina, aquella italiana que vino a estar unos meses cuando yo rotaba con Andrés y, por suerte, se quedó entre nosotros.

A l@s cirujan@s de la sección de hepatobiliar, por estar dispuest@s a colaborar siempre y hacerlo todo fácil, porque trabajar con vosotr@s es un lujo.

A “la gente del labo”, porque sin vosotros hacer una tesis así habría sido totalmente imposible para una clínica como yo. Especialmente agradecer a Blanca y a Belén, por vuestra ayuda y todo el trabajo que habéis hecho con la ddPCR y organoides, gracias por vuestro tiempo y dedicación. A Paco, BÁSicamente IMPRESCINDIBLE. Gracias por todo: por tu ayuda, por tus ánimos, por tus ideas, tus análisis, por estar ahí siempre dispuesto para lo que necesite... y permanentemente con una sonrisa :)

A las chicas de Biobanco, por vuestro gran trabajo diario, vuestra profesionalidad y ayuda, por la rapidez en responder a las necesidades y contestar todas mis dudas.

A la Unidad de Medicina de Precisión, Bioinformática y Bioestadística. A Pilar, por tu ayuda en todo momento, tus consejos, revisión y correcciones. A Koke, por ser capaz de analizar, ordenar y dar luz a los resultados. Gracias por tu gran trabajo, discreto y sin hacer ruido. Otro imprescindible, ya que sin ti me temo que seguiríamos dando vueltas en bucle. A Juan, por tu capacidad de entender las necesidades del trabajo, tus ideas y aportaciones, así como tu disponibilidad en todo momento.

A mis amig@s, sobre todo a “mis chatis”, con las que formo “un trío inseparable desde tiempos inmemoriales”. Gracias por estar ahí siempre y de una manera incondicional.

A mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermano, gracias por aguantarme todos los días, por vuestro apoyo ilimitado y por ayudarme a convertirme en lo que soy. A mis abuelos, gente humilde y trabajadora, a los que he tenido la suerte de conocer y de los que he aprendido tantas cosas, incluso a vivir esta enfermedad “desde el otro lado“.

A los pacientes y sus familias, porque ellos son los verdaderos “protagonistas”. Gracias por colaborar con la investigación, por vuestra gratitud, por confiar en nosotros y enseñarnos a saber valorar lo realmente importante en la vida.

A todos y, si me dejo a alguien, espero me disculpe: **MUCHAS GRACIAS!!**

Sin enrollarme más, empiezo con mi tesis, que espero sea de interés.

Cura a veces, trata con frecuencia, consuela siempre
Hipócrates (siglo V a.C - siglo IV a.C)

Índice

1.	Introducción	7
1.1	Epidemiología, etiopatogenia y retos clínicos del cáncer de páncreas	9
1.2	Grupos moleculares en adenocarcinoma de páncreas	19
1.2.1	Alteraciones moleculares del adenocarcinoma de páncreas	19
1.2.2	Hacia una clasificación transcriptómica del cáncer de páncreas	33
1.3	Biopsia líquida en cáncer de páncreas	29
1.3.1	Métodos de biopsia líquida más utilizados en adenocarcinoma de páncreas	30
1.3.2	ctDNA como herramienta para el diagnóstico precoz	32
1.3.3	ctDNA en el contexto perioperatorio y en el seguimiento	35
1.3.4	ctDNA para monitorización de tratamiento en enfermedad no resecable	38
1.3.5	ctDNA como técnica de caracterización molecular	41
1.4	Cultivo de organoides en cáncer de páncreas	45
1.4.1	Establecimiento de organoides de pacientes con adenocarcinoma de páncreas	47
1.4.2	Organoides como modelo de estudio de la biología del adenocarcinoma de páncreas	48
1.4.3	Uso de organoides para identificación de tratamientos personalizados en cáncer de páncreas	50
2.	Hipótesis y objetivos	55
3.	Materiales y métodos	59
3.1	Diseño del estudio	61
3.2	Selección de pacientes con adenocarcinoma de páncreas estadio IV	64
3.3	Procesamiento de las muestras de tejido y extracción de ADN/ARN	68

3.4	Procesamiento de las muestras de plasma y extracción del ADN circulante	68
3.5	Cuantificación y análisis de la calidad del ADN de las muestras de plasma y tejido	69
3.6	Secuenciación del exoma completo de muestras de plasma y tejido	69
3.7	Análisis de las mutaciones de <i>KRAS</i> mediante ddPCR en las muestras de plasma	70
3.8	Organoides	73
3.8.1	Generación de organoides de adenocarcinoma de páncreas a partir de tejido de pancreatoclectomía	74
3.8.2	Caracterización morfológica de organoides	76
3.8.3	Caracterización molecular de organoides y tejido tumoral pareado mediante WES	76
3.8.4	Ensayos de sensibilidad a fármacos	78
3.9	Análisis bioinformático de los resultados de secuenciación del exoma	78
3.10	Análisis estadístico	80
4.	Resultados y discusión	83
4.1	Descripción de las alteraciones genómicas de las muestras de tejido paraafinado de pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado mediante el estudio de secuenciación del exoma completo (objetivo 1)	85
4.1.1	Distinción de las anomalías germinales y somáticas, patogénicas o potencialmente patogénicas	87
4.1.2	Identificación de aquellas alteraciones que puedan responder a tratamiento dirigido o predecir diferente respuesta a tratamientos	90
4.2	Descripción de las anomalías genómicas de pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado que no han recibido tratamiento mediante el estudio de secuenciación del exoma completo en muestras de plasma (ctDNA) (objetivo 2)	94

4.2.1	Determinación de las alteraciones patogénicas o potencialmente patogénicas, reconocimiento de aquellas que puedan tener impacto en el tratamiento e identificación de vías implicadas en el desarrollo tumoral o con valor pronóstico	94
4.2.2	Evaluación de la concordancia molecular entre tejido y plasma y de la utilidad del estudio de ctDNA como método de caracterización de la heterogeneidad intratumoral	102
4.3	Valoración de la utilidad clínica de la detección y monitorización en plasma mediante ddPCR de mutaciones de <i>KRAS</i> como biomarcador en pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado (objetivo 3)	109
4.4	Evaluación de la génesis de modelos de organoides de adenocarcinoma de páncreas humano a partir de muestras obtenidas en piezas de pancreatectomía (objetivo 4)	123
5.	Conclusiones	141
6.	Resumen	143
7.	Bibliografía	147
8.	Anexos	
8.1	Abreviaturas	161
8.2	Lista de Tablas	167
8.3	Lista de Figuras	167

INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología, etiopatogenia y retos clínicos del cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas es el tumor digestivo de peor pronóstico y el de mayor aumento en número de casos en las últimas décadas. Cuando se aborda el tema del cáncer de páncreas habitualmente se hace referencia a la histología de adenocarcinoma, que supone el 85-90% de las neoplasias pancreáticas. El resto de subtipos de tumores de este órgano son fundamentalmente los tumores neuroendocrinos (alrededor del 5%), carcinomas acinares o pancreatoblastomas.

Se estima que en 2020 se diagnosticaron 495.773 casos de cáncer de páncreas en todo el mundo, lo que hace que se posicione en el duodécimo lugar en incidencia. El número de fallecidos por este tumor se calculó en 466.003, suponiendo la séptima causa de mortalidad por cáncer, con una tasa de letalidad de 0.94 (GLOBOCAN, <https://gco.iarc.fr/> (acceso el 25 de noviembre de 2023)) (1). Considerado hasta el momento un tumor “raro” o poco frecuente, el número de nuevos diagnósticos está aumentando tanto que se prevé que se convertirá en la segunda causa de muerte por cáncer en Estados Unidos el año 2040 (2). Las áreas a nivel mundial con mayor incidencia de este tipo tumoral son Europa, América del Norte y Oceanía (3).

A nivel nacional es el octavo tumor en frecuencia y, sin embargo, ya es el tercero en mortalidad por cáncer, responsable del 7% de muertes secundarias a enfermedad oncológica. Se estima que en 2023 se diagnosticarán 9280 casos nuevos (pasando a ser el séptimo en incidencia), con una mortalidad que continúa aumentando fundamentalmente por el aumento del número de nuevos diagnósticos (4).

Es un tumor relacionado con la edad, con una mayor incidencia en mayores de 70 años. Pese a ello, en los últimos años crece la preocupación por el aumento de casos en pacientes más jóvenes. Aunque la baja incidencia numérica en estos grupos hace que un menor aumento en el número de casos se refleje en mayor aumento proporcional, algunos estudios han descrito incrementos importantes de

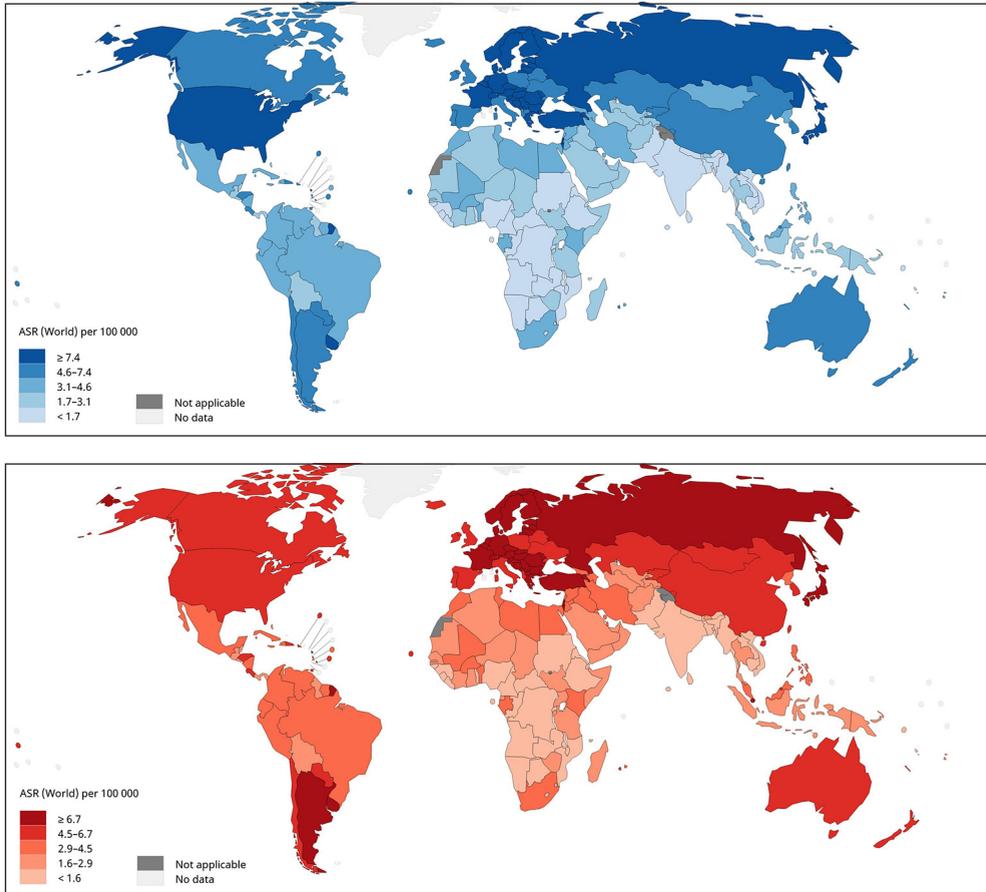


Figura 1. Mapas representativos de las tasas de incidencia (A) y mortalidad (B) del cáncer de páncreas estimados en ambos sexos en 2020 según GLOBOCAN (ajustadas por edad según población estándar mundial, por 100 000 habitantes).

la incidencia en edades tempranas. Según un análisis estadounidense, desde 1995 a 2014 la incidencia ha aumentado desde un 0.77% en el subgrupo de 45 a 49 años a un 2.47% en aquellos de 30 a 34 años y hasta un 4.34% en la franja de 25 a 29 años (5). Otro estudio de la tendencia de las tasas de incidencia en Estados Unidos entre 2000 y 2018 también observa un mayor grado de aumento en la incidencia en mujeres menores de 55 años, frente a otros subgrupos poblacionales, sugiriendo una posible influencia de los hábitos de vida en estos cambios demográficos (6).

Este aumento del número de casos no sólo preocupa como dato en sí mismo, sino también porque su alta tasa de mortalidad va camino de convertirlo en un gran problema de Salud Pública. Pese a las mejoras en las técnicas quirúrgicas y los avances en cuanto a nuevos tratamientos sistémicos, sigue siendo el tumor de peor supervivencia estimada a 5 años, un 12% si tenemos en cuenta todos los estadios. De hecho, considerando juntos hombres y mujeres, alcanza la tercera causa de muerte por cáncer en países desarrollados, con una mortalidad que lamentablemente ha seguido aumentando en hombres (de un 12.1 por 10000 habitantes en el año 2000 a un 12.7 en 2020 (7)). Tanto la incidencia como la mortalidad es algo mayor en hombres que mujeres, así como en algunas áreas geográficas frente a otras. Se sospecha una relación importante con determinados hábitos o factores de riesgo, que condicionarían algunas de estas diferencias poblacionales (3).

Factores de riesgo

En la mayoría de los pacientes es difícil identificar una causa clara relacionada directamente con el desarrollo este tipo tumoral, aunque existen diversos factores que pueden generar cierta predisposición al mismo.

Entre los factores modificables o ambientales relacionados, el tabaco es el que más se ha asociado con el cáncer de páncreas, duplicando aproximadamente la probabilidad de desarrollar este tumor (OR de 2.2 en fumadores activos frente a no fumadores, mayor en grandes fumadores y con largos periodos de hábito tabáquico) (8). El consumo de alcohol, también se ha relacionado con el aumento de riesgo de aparición de cáncer de páncreas, sobre todo con alta ingesta diaria (>15-30 gramos diarios). Este factor, a su vez, está claramente relacionado con la génesis de la *pancreatitis* crónica, que aumenta unas tres veces el riesgo de este tipo de cáncer (9). Igualmente, los estilos de vida y alimentación que favorecen el desarrollo del “*síndrome metabólico*”, tan común en nuestra sociedad, que también se ha asociado al aumento de riesgo de cáncer de páncreas. Así, el consumo de grasas

saturadas, carnes procesadas, bebidas azucaradas y bajos niveles de actividad física, contribuyen al desarrollo de diabetes mellitus, obesidad y cáncer de páncreas (10).

Predisposición hereditaria

Los factores hereditarios contribuyen claramente en el desarrollo de este tumor en algunos casos, no sólo en forma de síndromes hereditarios claramente establecidos. Se ha definido el “cáncer de páncreas familiar” como aquellos casos en los que, al menos, hay dos familiares de primer grado afectados por este tumor y que no cumplan criterios para síndromes hereditarios conocidos. Esto no equivale que en todos estos individuos se haya detectado un gen transmitido por vía hereditaria responsable del desarrollo del tumor, sino que probablemente la propensión en estos casos se deba a alteraciones en genes de baja penetrancia no totalmente identificados. Aunque la distribución según áreas geográficas es muy variable y la gran mayoría de casos de cáncer de páncreas se debe a mutaciones somáticas, hasta un 10% de los pacientes con adenocarcinoma de páncreas tienen mutaciones germinales conocidas que les predisponen a sufrir este tipo tumoral (11). Gran parte de alteraciones de alta penetrancia ligadas al cáncer de páncreas hereditario conocidas las encontramos en los genes de las vías reparadoras del daño del ADN. Los genes alterados de forma más común serían *BRCA 1* y *2*, responsables del síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario (5-9% de pacientes con cáncer de páncreas en poblaciones no seleccionadas); y *ATM*, del síndrome ataxia-telangiectasia (3-4 %). Menos comunes (alrededor del 1%), pero relevantes por la posibilidad de respuesta a tratamiento con inmunoterapia, son los tumores con deficiencia de los genes de reparación de los errores de apareamiento del ADN (mismatch repair) ligados al síndrome de Lynch: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Otros genes identificados como causantes de cáncer hereditario, serían *TP 53*, *CDKN2A*, o *APC* (12).

Síndrome hereditario	Gen o genes implicados	Riesgo relativo de cáncer de páncreas	Otros tumores asociados
Sd. Hereditario de cáncer de mama y ovario	<i>BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD51C</i>	2-6	Mama, ovario, próstata, testículo, melanoma
Sd. de Lynch	<i>MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2</i>	8-9	Colon, endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, tracto urinario, cerebro, glándulas sebáceas cutáneas
FAP	<i>APC</i>	4-5	Colon, desmoides, duodeno, tiroides, cerebro, ampuloma, hepatoblastoma
Sd. de Peutz–Jeghers	<i>STK11/LKB1</i>	130	Gastro-esofágicos, intestino delgado, colon, pulmón, mama, endometrio y ovario
Sd. de melanoma familiar atípico con molas múltiples	<i>CDKN2A</i>	10-65	Melanoma
Pancreatitis hereditaria	<i>PRSS1 y SPINK1</i>	50-70	-
Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	1-6	-
Sd. Ataxia-telangiectasia	<i>ATM</i>	5	Leucemias y linfomas
Cáncer pancreático familiar	No identificados	1-35	-

Tabla 1. Resumen de los síndromes de cáncer de páncreas hereditario.

Sd: síndrome, FAP: polipomatosis adenomatosa familiar.

Pese a que estos síndromes hereditarios no son muy frecuentes en la población general salvo en áreas específicas, cada vez se recomienda de forma más sólida la realización de estudio en línea germinal de los genes *BRCA*, *ATM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* a todos los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de páncreas. Esta recomendación, ya recogida desde 2019 en las guías americanas NCCN (the National Comprehensive Cancer Network Guidelines), viene determinada no sólo por la posibilidad de prevención en familiares sanos portadores de estas alteraciones, sino por la implicación terapéutica para el propio paciente: posibilidad de recibir tratamiento con olaparib en pacientes con mutaciones de *BRCA* en línea germinal o inmunoterapia en síndrome de Lynch (13).

Patogénesis

En líneas generales, la evolución tumoral se produce como resultado del desarrollo de mutaciones somáticas, reordenamientos de cromosomas, variaciones en el número de copias génicas y cambios epigenéticos que condicionan inestabilidad genómica. Esto genera pérdida de genes supresores de tumores y aumento de actividad de oncogenes, con la consecuente alteración de los ciclos de regulación de la proliferación celular. Esta desregulación generalmente va a favorecer el crecimiento de las células neoplásicas, confiriéndoles ventajas frente a las células sanas.

En el caso concreto del adenocarcinoma de páncreas, al modelo clásico de la progresión “paso a paso o secuencial”(14) en los últimos años se ha añadido la teoría de evolución “puntuada o catastrófica” (15).

Según la hipótesis “stepwise, paso a paso o secuencial”, los tumores pancreáticos se producirían como consecuencia del acúmulo progresivo de alteraciones moleculares en las células epiteliales del órgano sano, de modo que en primer lugar se generaría displasia celular y de forma gradual se irían transformando en lesiones microinvasoras y finalmente en plenamente agresivas, todo ello como resultado de

la suma de defectos genéticos. Además, las neoplasias intraepiteliales serían capaces de extenderse hacia otras zonas del páncreas y colonizarlas, fenómeno conocido como “cancerización ductal” (16,17). Las lesiones precursoras serían las neoplasias intraepiteliales pancreáticas o PanIN (con grados de atipia progresivos 1 a 3, en las que se identifican progresivamente mutaciones en los genes *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* y *SMAD4*); las neoplasias mucinosas papilares intraductales o TPMP (también con diferentes tipos de displasia y adquisición progresiva de alteraciones moleculares a medida que aumenta ésta) y las neoplasias mucinosas quísticas o MCN (menos estudiadas a nivel molecular) (18). A pesar de todas las evidencias del potencial de malignización, hay que tener en cuenta que estas lesiones tienen una alta prevalencia en población general comparado con la relativa incidencia baja del cáncer de páncreas: hasta un 75% de la población presenta PanINs de bajo grado, detectando lesiones de alto grado hasta en un 5% de individuos en series de autopsias. Otro dato a considerar es que estas lesiones precursoras no se presentan con más frecuencia en personas con alteraciones predisponentes al cáncer de páncreas, por lo que todo esto hace necesario continuar estudiando la biología molecular y evolución natural de este tipo de lesiones pancreáticas (19).

Más recientemente se ha postulado como teoría del origen de estos tumores el modelo de evolución “puntuada o catastrófica”. Sabemos que en la clínica muchos pacientes desarrollan rápidamente el tumor, con presencia de enfermedad metastásica en muy cortos periodos de tiempo, lo que iría en contra de una evolución progresiva de años desde lesiones premalignas hasta su malignización. A nivel molecular se ha podido observar que existe la posibilidad de inactivación de genes reguladores de forma simultánea, con reordenamientos cromosómicos complejos, que llevarían a un rápido desarrollo y capacidad de metastatización tumoral. Así, en un trabajo publicado en 2016, hasta en dos tercios de los tumores analizados se logró demostrar que ocurrían fenómenos complejos como son la cromotripsis (fragmentación y reordenamiento genómico extenso que afecta a uno o varios cromosomas y genera hasta miles de alteraciones estructurales en un único evento) y la poliploidización

(obtención de juegos de cromosomas adicionales por la célula tumoral). Estas grandes alteraciones generarían una alta inestabilidad genómica, con inactivación simultánea de *CDKN2A*, *TP53* y *SMAD4*, hecho que apoyaría la posibilidad de que la génesis de los tumores pancreáticos no fuera progresiva, sino brusca y con alto potencial de diseminación precoz (15).

Retos clínicos actuales del adenocarcinoma de páncreas

Ante todos estos datos pronósticos tan negativos, existe una gran necesidad de mejora en los métodos diagnóstico-terapéuticos del adenocarcinoma de páncreas.

Uno de los motivos de su mala evolución es que el diagnóstico es generalmente tardío, ya que sólo un 10-15% de los pacientes presentan tumores resecables y más de la mitad presentan metástasis en ese momento (20). Pese a que existen factores predisponentes de cáncer de páncreas y que se conocen algunas lesiones pancreáticas que se pueden considerar precursoras, no disponemos hasta el momento de ningún método de cribado efectivo en población general. Ninguna herramienta ha demostrado beneficio potencial en cuanto a reducción de morbilidad de forma global (21). La evidencia para realizar screening parece mayor en los casos de alto riesgo de desarrollo de cáncer de páncreas por síndromes hereditarios, aunque la recomendación es realizar el seguimiento de estos pacientes en grandes centros con áreas especializadas en esta tarea y, preferiblemente, enmarcados en proyectos de investigación con equipos multidisciplinares dedicados a ello (22).

Otro de los factores que llevan a un diagnóstico habitualmente en fases avanzadas de la enfermedad es la inespecificidad de los síntomas, que se solapan en la mayoría de casos con otras patologías. Los más frecuentes son pérdida de apetito y de peso, astenia, molestias abdominales difusas fundamentalmente tipo dispepsia, alteraciones en el hábito deposicional y dolor lumbar (23). Además, el único biomarcador sérico establecido en la práctica clínica como de utilidad en cáncer

de páncreas, el antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9), no ha demostrado suficiente sensibilidad y especificidad para poder ser utilizado de forma aislada como método diagnóstico ni de cribado (24).

De todos modos, el mal pronóstico del adenocarcinoma de páncreas no sólo viene determinado por un diagnóstico tardío. Incluso los pacientes intervenidos con intención curativa presentan una alta tasa de recidivas en los primeros años (alrededor del 80%) y menos de la mitad están vivos a los 5 años, pese a las mejoras en las técnicas quirúrgicas y tratamientos sistémicos (20,25). Por ello y por los índices de morbi-mortalidad no despreciables de la cirugía pancreática, que en muchos casos impiden o limitan el inicio de quimioterapia adyuvante, en los últimos años se han puesto en marcha múltiples ensayos clínicos que intentan demostrar el beneficio de administrar tratamiento preoperatorio en tumores resecables. Pese a la fortaleza del racional de esta estrategia y los resultados prometedores de algunos estudios fase II, todavía no se dispone de suficiente evidencia para administrar neoadyuvancia en estos estadios fuera del marco de ensayos clínicos (26,27).

Tras la recaída y en casos de irreseccabilidad o enfermedad avanzada al diagnóstico, la evolución de los pacientes con adenocarcinoma de páncreas en el momento actual es generalmente mala. Aunque en los últimos quince años se han conseguido mejoras en la supervivencia con la combinación de fármacos citotóxicos, la mediana de supervivencia en este escenario no alcanza los doce meses (28–30). Además de estos nuevos esquemas de quimioterapia, en 2019 por primera vez se demostró el beneficio de un fármaco dirigido en cáncer de páncreas: olaparib, para pacientes con mutaciones germinales de *BRCA* (31). Esto no sólo es importante por la mejora en tiempo a la progresión en este subgrupo de pacientes, que por el momento es reducido (4-7%), sino porque abrió la puerta al tratamiento personalizado en este tumor. Hace años que sabemos que el adenocarcinoma de páncreas, con mal pronóstico de forma global pero a la vez heterogéneo en su evolución, puede presentar alteraciones genéticas subsidiarias de recibir tratamientos anti diana (32). De hecho,

en un estudio retrospectivo estadounidense más reciente, tras el análisis molecular de muestras tumorales de pacientes con adenocarcinoma, se identificaron anomalías moleculares frente a las que es posible administrar tratamiento dirigido hasta en un 25% de pacientes. Al analizar los beneficios obtenidos con dichas terapias, se objetivaba impacto en la supervivencia en los pacientes que pudieron recibirlas, no observado en el subgrupo que las poseía pero que no se trataban con fármacos específicos (33).

Uno de los problemas más importantes que se presenta tanto para el diagnóstico, como para la búsqueda de factores pronósticos o predictivos e incluso la respuesta a los tratamientos en el adenocarcinoma de páncreas, es su microambiente. Una característica fundamental de los tumores pancreáticos es la presencia de un estroma altamente denso, conocido como reacción desmoplásica, que encontramos tanto en el tumor primario como en las metástasis. Esta matriz densa hace que la celularidad de las biopsias sea muy escasa, lo que dificulta incluso en algunas ocasiones la obtención de material válido para el diagnóstico. La mayor parte de las veces estas muestras no van a ser idóneas para la realización de estudios moleculares completos y no permiten, por tanto, la búsqueda de anomalías subsidiarias de estos tratamientos dirigidos. Además de esta dificultad, inicialmente se pensó que estos elementos generaban una barrera mecánica que obstaculizaba la llegada de fármacos antitumorales, por lo que tenían un efecto negativo cara a la terapéutica y podían suponer una diana terapéutica (34). Sin embargo, los resultados negativos de muchos ensayos clínicos con fármacos frente a elementos estromales y la evidencia de mayor agresividad en los tumores desprovistos de estroma en modelos tumorales en ratón, han cuestionado este papel (35,36).

Frente a esta serie de problemas y con el fin de mejorar las expectativas del adenocarcinoma de páncreas, es fundamental la búsqueda de biomarcadores que posibiliten diagnósticos más tempranos y tratamientos personalizados. Sin duda, existen dos herramientas con gran potencial para conseguir estos objetivos: el uso

de organoides y la biopsia líquida, esta última de inmensa relevancia en este tumor con gran dificultad de obtención de tejido tumoral óptimo para estudios moleculares.

1.2. Grupos moleculares en adenocarcinoma de páncreas

La secuenciación del exoma en cáncer de páncreas se describe por primera vez en un trabajo publicado en 2008 (37) y, desde entonces, no han cesado los esfuerzos para intentar descifrar los mecanismos moleculares que confieren la agresividad biológica propia de este tumor.

En la última década, gracias al estudio a nivel genómico y transcriptómico de muestras tumorales (fundamentalmente tumor primario obtenido de pancreatectomía), se han identificado las alteraciones moleculares más frecuentes y diferentes subtipos genómicos del adenocarcinoma de páncreas, con desigualdades biológicas que condicionan distinto pronóstico y supervivencia (38–44).

Alteraciones moleculares del adenocarcinoma de páncreas

Más de un 90% de los adenocarcinomas de páncreas presentan mutaciones activadoras en el oncogen *KRAS*, lo que condiciona una transcripción anómala y la producción de una proteína Ras constitutivamente activada, que generará una señal aberrante sobre las vías de proliferación y supervivencia celular. Otras alteraciones muy comunes en estos tumores pancreáticos, presentes también en lesiones precursoras y conocidas ya antes de realizar estudios de secuenciación masiva, son la pérdida de función de los genes supresores de tumores *TP53* (en un 80%), *CDKN2A* (60%) y *SMAD4* (40%) (38). A pesar de que este tipo tumoral tiene de forma global un mal pronóstico, sabemos que el comportamiento biológico es heterogéneo. El conocimiento profundo de la biología tumoral probablemente pueda optimizar el manejo de los pacientes y, con ello, mejorar los resultados, por lo que es esencial continuar con la investigación en este campo.

Mutaciones somáticas simples y genes “driver”

Los diversos trabajos en los que se ha realizado la secuenciación de tumores pancreáticos coinciden en que la alteración molecular más frecuente en adenocarcinoma de páncreas son las mutaciones somáticas simples (mutaciones puntuales, inserciones o deleciones (indels)), una media aproximada de 40 por exoma (33,41). Además de los cuatro genes comentados mutados con alta frecuencia (*KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* y *SMAD4*), se han identificado otros de menor prevalencia a nivel individual, pero que de forma global presentarían más mutaciones de lo que sería esperable de forma casual, como son: *ARID1A*, *KDM6A*, *RNF43*, *TGFBR2*, *GNAS*, *MAP3K21*, *BRAF*, *SMARCA4*, *ACVR2A*, *ACVR1B* y *NRAS*.

En general, las mutaciones en estos genes se podrían agrupar en 13 vías y procesos de señalización celular con potencial oncogénico: la vía de señalización RAS, la regulación de la transición de fase del ciclo celular G1/S, la vía TGF β , la de señalización de quinasa amino-terminal (JNK) de JUN, la vía de la integrina, WNT-Notch, Hedgehog, la apoptosis, la vía de reparación y control de daño del ADN, la señalización dependiente de GTPasas pequeñas, la vía de invasión y de adhesión de células homofílicas (37) y , la más recientemente descrita, vía axonal o SLIT/ROBO (45). Estas vías estarían funcionando de forma patológica en la gran mayoría de tumores pancreáticos, aunque de forma diferente en cada tumor concreto, lo que conferiría esa gran diversidad biológica entre tumores. Aun así, parece que las alteraciones en los cuatro genes driver de mayor frecuencia son las que mayor impacto tienen en la progresión y el pronóstico del adenocarcinoma de páncreas (46–48). El hecho de que las mutaciones de *KRAS* sean las más frecuentes, se detecten en las fases iniciales del desarrollo tumoral (incluso en las lesiones precursoras), y que en modelos de ratón se haya evidenciado que son suficientes para iniciar la carcinogénesis pancreática (49), apoyan la idea de que la vía oncogénica RAS sea el driver principal en este tumor. En los casos poco frecuentes sin mutaciones de *KRAS*, la mayor parte presentan alteraciones de otros genes de esta misma vía RAS-MAPK

(como *GNAS*, *BRAF*, o *CTNNB1*) o de la vía mTOR, reforzando la importancia de la vía RAS en este tumor. En este subgrupo de tumores *KRAS* no mutados también encontramos mayor porcentaje de mutaciones germinales en genes de riesgo familiar (40,43).

Debido a la alta frecuencia de mutaciones somáticas simples del adenocarcinoma de páncreas, también se han podido establecer diferentes firmas mutacionales de sustitución de bases en este tipo tumoral (50,51). Las tres firmas mutacionales más frecuentes identificadas serían las desaminaciones de citosina asociadas a la edad (firmas mutacionales 1 y 5) (51), las deficiencias de recombinación homóloga o HRD (firma 3) (52) y las de las deficiencias de los genes reparadores del daño del DNA o mismatch repair (MMRD) (53). La importancia de estos dos últimos subgrupos (HRD y MMRD) radica en que, en muchas ocasiones, se desarrollan en individuos con una predisposición genética por la inactivación en línea germinal de uno de los alelos en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* o *RAD51C* (en los casos HRD); o en *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* o *MSH6* (en MMRD). Estas alteraciones no sólo tendrán repercusión a título preventivo y de seguimiento estrecho en pacientes con predisposición genética hereditaria, sino que en la actualidad son importantes por el impacto pronóstico y, sobre todo, predictivo de respuesta a determinados tratamientos en los pacientes con adenocarcinoma de páncreas (54).

Variantes estructurales, variación de número de copias (CNV) e inestabilidad genómica

Según la teoría más actual del desarrollo o “evolución catastrófica” del adenocarcinoma de páncreas, se postula que, tras las fases iniciales en las que predominaría la aparición de mutaciones puntuales, se producirían los eventos de poliploidización y cromotripsis, en los que se generaría mayor inestabilidad genómica y un aumento llamativo en la capacidad de invasividad y metastatización. En estos grandes cambios se producirían de forma simultánea la pérdida de genes

supresores de tumores (sobre todo de *SMAD4*) y la ganancia de oncogenes (*KRAS* y *GATA6* predominantemente), que acelerarían el proceso oncogénico (15,44,55).

Nuevamente, los oncogenes en los que más frecuentemente se producen aumento del número de copias en adenocarcinoma de páncreas son *KRAS* (12p12.1), *GATA6* (18q11.2), *MET* (7q31.2), *NOTCH1* (9q34.3), *ERBB2* (17q12), *AKT2* (19q13) y *MYC* (8q24.2). Frente a estos, en los genes supresores de tumores *CDKN2A* (9p21.3), *SMAD4* (18q21.2), *TP53* (17p13.1), *BRCA1* (17q21.31), *ARID1A* (1p36.11), *PTEN* (10q23.31), *PBRMI* (3p21.1) y *SMARCA4* (19p13.2), encontraremos con mayor frecuencia una pérdida de número de copias (43).

En 2015, en base al análisis de los patrones de variación en las estructuras cromosómicas o reordenamientos de 100 muestras de pancreatocoma, se generó una clasificación genómica con cuatro subgrupos con potencial impacto clínico (44):

- Subtipo 1 o “stable”: Presentan 50 o menos variaciones estructurales y frecuentemente aneuploidía generalizada, suponiendo un 20% de las muestras.

- Subtipo 2 o “locally rearranged”: Muestran eventos en uno o dos cromosomas, ya sean amplificaciones en regiones focales o reordenamientos genómicos complejos. Aproximadamente un tercio tienen ganancias de los oncogenes más conocidos y, hasta un 1-2 %, de genes potencialmente accionables con tratamientos dirigidos. Globalmente representaron el 30% de los casos analizados

- Subtipo 3 o “scattered”: Un 36% de las muestras se clasificaron en este subgrupo, caracterizado por presentar un daño moderado cromosómico, con menos de 200 eventos estructurales.

- Subtipo 4 o “unstable”: En estos tumores (14% de las muestras) se evidenciaba un gran número de variaciones estructurales, mayor de 200, lo que sugiere que existan defectos en los mecanismos de mantenimiento y reparación de los errores del ADN. Sería el subgrupo en el que cabría esperar mayor respuesta a los tratamientos basados en platino o inhibidores de PARP.

Esta división en distintos subgrupos, pese a la posible aplicabilidad clínica con la que se propuso, no está aceptada actualmente como herramienta para la práctica habitual para manejo terapéutico o como información pronóstica.

Hacia una clasificación transcriptómica del cáncer de páncreas

Varios han sido los grupos de investigación y autores que han propuesto diversas clasificaciones a partir de estudios de expresión génica en adenocarcinoma de páncreas, con diferentes subtipos transcripcionales que se superponen parcialmente. Al igual que en el caso anterior, tampoco ninguna de estas ellas se ha reconocido como universal y de aplicación en la práctica clínica en el momento actual, aunque se han considerado tres de ellas como las primeras y de mayor relevancia:

1- Collisson et al. (41) describen por primera vez en 2011 la existencia de tres grupos moleculares diferenciados a partir de análisis de expresión génica mediante microarrays de muestras tumorales de piezas de pancreatectomía micro disecadas, líneas celulares humanas y de ratón. Desarrollaron una firma genómica que incluía 62 genes, expresados diferencialmente en cada uno de los subtipos. Además, fueron validados en otro set de muestras, lo que añade robustez al análisis. Los subtipos de esta clasificación serían:

A. Clásico: alta expresión de genes epiteliales y asociados con la adhesión celular, siendo el subgrupo de mejor pronóstico tras resección, con la mayor supervivencia independientemente de otros factores clínico-patológicos.

B. Cuasi-mesenquimal: predominan los genes mesenquimales, que conferirían mayor agresividad, siendo el subgrupo con la peor supervivencia tras cirugía.

C. Exocrino-like: sería el subgrupo con expresión relativamente más alta de genes de enzimas digestivas. No fue identificable en los análisis de líneas celulares, por lo que los mismos autores postulan la posibilidad de que no sea un subgrupo real, sino que se obtuviese por la presencia de tejido pancreático normal que pudiese artefactar los resultados.

Adicionalmente, en este trabajo demuestran el potencial efecto de silenciar algunos genes altamente expresados en el subgrupo clásico frente al cuasi-mesenquimal (como *GATA6* y *KRAS*). También testaron la sensibilidad a fármacos en líneas celulares, con resultados muy diferentes en ambos subtipos, lo que reforzaría una posible utilidad de esta clasificación no sólo pronóstica sino también predictiva de respuesta.

2- Moffitt et al. (42) realizan un análisis por separado del tejido tumoral, tejido sano y el estroma, tras microdissección virtual de las muestras, 145 de ellas de tumores primario y 61 de metástasis. En esta clasificación se distinguen:

A. Subtipos estromales:

- a. Normal, con alta expresión de marcadores de células esteladas pancreáticas (actina, vimentina, desmina) y con mejor pronóstico (mediana de supervivencia de 24 meses y tasa de supervivencia al año de 82%)
- b. Activado, con peor pronóstico y en el que predomina la expresión de genes relacionados con macrófagos y estados de activación de fibroblastos, asociados con la progresión tumoral

B. Subtipos tumorales:

- a. Clásico: la expresión génica de este subgrupo es superponible al subgrupo clásico de la clasificación de Collisson et al. y, al igual que en esta clasificación, serían los tumores de mejor pronóstico (supervivencia mediana de 19 meses, frente a los 11 meses del subgrupo basal-like)
- b. Basal-like: reproduce las características génicas del subgrupo basal de otros tipos tumorales como vejiga y mama. Otro dato más que indica una mayor agresividad de este subtipo es que a él pertenecen la mayoría de las muestras provenientes de metástasis, aunque parece que en este subgrupo el beneficio obtenido al administrar quimioterapia adyuvante sería proporcionalmente mayor al del clásico.

Según estos autores, el tercer grupo caracterizado por Collisson et al., el exocrino-like, realmente sería un falso subgrupo tumoral. Correspondería a la expresión génica predominante del tejido pancreático normal y, por tanto, probablemente se trataría de muestras de muy poca celularidad tumoral.

3- Bailey et al. (39), poco más tarde, definirían cuatro subgrupos moleculares tras el análisis de perfiles de expresión de ARN de 96 muestras de tumor primario con, al menos, un 40% de celularidad. Cada uno de ellos se asociaría a distintas características clínico-patológicas y supervivencia. En base al perfil de expresión diferencial de factores de transcripción y de las dianas en las cascadas de señalización de las vías importantes de diferenciación en el desarrollo del páncreas, distinguen los subtipos:

A. Escamoso: Representa el subtipo de peor pronóstico. Tienen, al igual que los tumores escamosos de otros órganos, alta expresión de genes implicados en la inflamación, la respuesta a la hipoxia, reprogramación metabólica, las vías TGF- β y MYC, autofagia y alta expresión de *TP63*. Se asociarían a mutaciones de *TP53* y *KDM6A*. Sería el subgrupo análogo al cuasi-mesenquimal de la clasificación de Collisson

B. Progenitor pancreático: Similar al subtipo clásico, predomina la expresión de genes esenciales para el desarrollo pancreático embriológico inicial y la formación de ductos (como *PDX1*), así como de la glicosilación de algunas apomucinas.

C. Inmunogénico: Presentan muchas características similares al subgrupo anterior, pero con un gran infiltrado inmunológico asociado. Tendrían alta expresión de genes de vías de señalización inmunitarias, sobre todo relacionados con actividad de linfocitos citotóxicos y células T reguladoras, por lo que podría ser un subgrupo en el que la inmunoterapia podría tener mayor papel.

D. Aberrantemente diferenciado endocrino exocrino (ADEX): Podría considerarse como un subgrupo del subtipo B (progenitor pancreático),

pero con mayor expresión de las vías de desarrollo pancreático de mayor madurez y diferenciación hacia páncreas exocrino o endocrino. Sería más parecido al subgrupo endocrino-like de Collisson.

Como se ha comentado, los autores realizan una analogía de sus cuatro subgrupos con los de las clasificaciones anteriores y justifican sus cambios y diferencias.

Estas tres clasificaciones se compararon directamente en el trabajo publicado en 2017 por el grupo “The Cancer Genomic Atlas” (TCGA), en el que se lleva a cabo un perfil genómico, transcriptómico y proteómico de las muestras de 150 muestras de tumor primario (43). Ante la dificultad de realizar el análisis de ARN con muestras de escasa celularidad, que en los tumores pancreáticos son gran parte de ellas, distinguen dos grupos: alta pureza ($\geq 33\%$, 76 de las 150 muestras) y baja pureza ($< 33\%$, las 74 restantes). Aplicando las técnicas de clustering de las tres clasificaciones previamente descritas (Collisson et al., Moffit et al. y Bailey et al.), concluyen que, mientras que los subgrupos clásico (o progenitor pancreático) y basal (o escamoso) se identifican independientemente de la pureza de las muestras, el resto sólo son reconocibles en las muestras de escasa pureza. Además, realizan análisis de metilación, proteómica y ARN no codificante en las muestras de alta pureza, que reafirma la presencia de los dos subgrupos: clásico y basal. Estos hallazgos sugieren que el resto de subgrupos realmente reflejarían la expresión génica de células no neoplásicas de las muestras, que contaminarían el análisis. Más recientemente esta idea ha sido consolidada en otro estudio en el que también relacionan estos dos subtipos con el pronóstico y la respuesta a tratamiento con FOLFIRINOX. Este grupo desarrolla además una plataforma genómica basada en la expresión de 16 genes para clasificar las muestras en estos dos subgrupos, con el objetivo de buscar su aplicabilidad en la clínica (56).

Aunque estas son las clasificaciones y trabajos más relevantes en lo que respecta a los subtipos transcriptómicos de adenocarcinoma de páncreas, encontramos otros estudios similares basados en el análisis de muestras de tumores primarios que los subclasifican entre dos y cinco subtipos, algunos de ellos superponibles a los anteriores (57–61). La tabla 2 recoge los principales subtipos de estas clasificaciones.

Publicación	Subtipos definidos que potencialmente se solapan				Específicos de clasificación
Collisson et al. (41)	Clásico	Cuasi-mesenquimal	Endocrino-like		
Moffit et al. (42)	Clásico	Basal-like			Estroma normal vs activado
Bailey et al. (39)	Progenitor pancreático	Escamoso	ADEX	Inmuno-génico	
Kim et al. (57)	Subtipo 2	Subtipo 1	Subtipo 3	Subtipo 1	
Janky et al. (58)	k3cl3	k3cl2	k3cl1		
Mueller et al. (59)	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 5	Cluster 4	Cluster 3
Maurer et al. (61)	Clásico	Basal-like			Estroma rico en matriz extracelular vs inmune
Puleo et al. (60)	Clásico puro	Basal-like puro			Desmoplásico, estroma activado

Tabla 2. Subtipos transcripcionales de las distintas clasificaciones de adenocarcinoma de páncreas más reconocidas.

Un dato importante y común de estas clasificaciones es que se han llevado a cabo, en su mayoría, tras el análisis de muestras de tumor primario. Más recientemente también se han intentado analizar y clasificar **muestras procedentes de metástasis**.

En este escenario, el primer estudio relevante por cantidad y calidad del material es el de Connor et al. (40), en el que se incluyen 289 pacientes con un total de 224 muestras de tumor primario y 95 de tejido metastásico, pareadas en 19 de los pacientes. En este último subgrupo evidencian que las firmas mutacionales se conservan en la evolución, siendo capaces de detectar los mismos subtipos de las clasificaciones de Collisson, Moffit y Bailey. Adicionalmente añaden un análisis de expresión de 76 genes relacionados con la hipoxia, generando un score con valor pronóstico, que también es bastante concordante en las muestras pareadas y es independiente de las variantes clínico-patológicas o las firmas mutacionales. De acuerdo a esta característica, los tumores considerados de alta hipoxia, tendrían una supervivencia significativamente menor, encontrándose en mayor proporción en los subtipos de peor pronóstico (basal) aunque pueden pertenecer a cualquiera de los subtipos.

Otra clasificación importante que considera el análisis de metástasis es la del grupo canadiense de Chan-Seng-Yue et al. (62). En este trabajo realizan secuenciación genómica y transcriptómica de muestras de tumor primario y metástasis. Tras microdissección láser para evitar al máximo la contaminación con elementos del estroma, confirman además los patrones de expresión mediante la técnica de “single-cell”. Con ello subclasifican los tumores en “Clásico-A”, “Clásico-B”, “Basal-like A”, “Basal-like B” e “Híbrido”. Los subtipos A y B serían subdivisiones de los subtipos clásico y basal de las clasificaciones previas y el “Híbrido” sería un nuevo grupo que englobaría aquellos tumores que no pueden incluirse en los subtipos anteriores, por la presencia de múltiples firmas de expresión. Al relacionar estos subtipos con los estadios clínicos, la mayoría de tumores clásicos (A o B) serían tumores de estadios iniciales y, por el contrario, los “Basal-like A” son muy

raros en tumores resecables. Por tanto, la mayoría de tumores considerados en las clasificaciones previas como subtipo basal, en esta clasificación realmente serían “Basal-like B” o “Híbridos”. Esta subdivisión además sugiere que el subgrupo “Basal-like” es muy diferente dependiendo del estadio: en enfermedad localizada los subtipos considerados en el resto de clasificaciones como agresivos (cuasi-mesenquimal, basal y escamoso) se subdividirían en “Basal-like B” e “Híbridos”; y en enfermedad metastásica el subgrupo “Basal-like A” tendría peor supervivencia y sería altamente quimiorresistente (no el subtipo B).

A pesar de todas estas evidencias y avances, a día de hoy no se dispone de una clasificación molecular del cáncer de páncreas única aceptada con aplicación clínica ni guías de actuación específica para estos subtipos tumorales. De hecho, la mayoría de los pacientes no se van a someter a una intervención quirúrgica y en muchas ocasiones el acceso al tejido de lesiones metastásicas es limitado, por lo que en gran parte de los casos no disponemos de muestras adecuadas para poder realizar estudios moleculares óptimos que favorezcan el desarrollo de la Medicina Personalizada en este tipo tumoral.

1.3. Biopsia líquida en cáncer de páncreas

En los últimos años, a raíz de la necesidad de nuevos biomarcadores para optimizar el manejo del cáncer, preferentemente no invasivos y dinámicos, prácticamente en todos los tumores se está desarrollando la técnica conocida como “biopsia líquida”. Esta nueva herramienta consiste en la detección de material genético tumoral, fundamentalmente en sangre, pero también en otros fluidos corporales como orina, saliva o líquido cefalorraquídeo. El análisis preciso de estas sustancias, obtenidos de forma mucho más sencilla e indolente que las biopsias tisulares, podría permitirnos tanto el diagnóstico, como una visión global y a tiempo real de las alteraciones moleculares del tumor y de las metástasis (63–68).

El uso de la biopsia líquida sería todavía más importante en adenocarcinoma de páncreas, tumor en el que por su localización y características histológicas (estroma de alta densidad y escasa celularidad neoplásica) la obtención de material tumoral de calidad óptima para estudios moleculares es tan dificultosa. La gran escasez de medios que posibiliten aplicar una “Medicina de Precisión” para mejorar resultados en esta neoplasia está aumentando el interés por la biopsia líquida, generando investigación en este campo en los distintos escenarios de esta enfermedad.

Métodos de biopsia líquida más utilizados en adenocarcinoma de páncreas

Aunque existen estudios de análisis molecular en cáncer de páncreas con potencial aplicación práctica en saliva, orina y jugo pancreático (69–72), sin duda, el mayor desarrollo de la biopsia líquida viene de la mano del análisis de muestras de sangre. Los biomarcadores sanguíneos fundamentales, además de los marcadores tumorales proteicos más clásicos, serían las células tumorales circulantes (CTCs), vesículas extracelulares (exosomas principalmente), las plaquetas educadas por tumor (secuestran ARN tumoral a través de microvesículas) y ácidos nucleicos libres (ADN y ARN). Pese a que cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas y existe gran cantidad de investigación en todas estas modalidades, la mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio en plasma del ADN libre circulante (cfDNA), concretamente de la fracción proveniente del tumor o ADN tumoral circulante (ctDNA) (73).

Disponemos de diversas técnicas para poder detectar y caracterizar ese ctDNA liberado a la sangre desde las células tumorales pancreáticas. Éstas deben ser lo suficientemente sensibles y específicas para poder detectar bajas concentraciones de ctDNA (sobre todo para casos de estadios más iniciales) y a la vez evitar que el ADN libre de otras células no tumorales pueda llevarnos a detectar falsos positivos (74).

Podríamos distinguir, de forma general, dos formas de caracterizar este ctDNA, con sus pros y sus contras:

- Métodos de secuenciación basados en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Detectan alteraciones conocidas, en general con mayor sensibilidad que las técnicas de nueva generación, más rápidos y sin requerir análisis bioinformáticos complejos. De menor a mayor sensibilidad tendríamos: la PCR cuantitativa (qPCR), capaz de detectar de forma rápida y más barata fracciones de mutación alélica (VAF) en torno al 10%; y la PCR digital (dPCR), técnica ultrasensible, que detecta VAF entre el 0.0001 y el 0.1%, con dos modalidades o subtipos: BEAMing (beads, emulsion, amplification and magnetics) y ddPCR (droplet digital PCR) (72,74).

- Secuenciación de nueva generación o “Next- Generation Sequencing” (NGS): Generan información mucho más amplia, ya que son capaces de encontrar variantes no conocidas, incluyendo alteraciones genéticas y epigenéticas, variantes estructurales y variaciones en el número de copias (CNV). Es una técnica más costosa, tanto en dinero como en tiempo y requiere de amplia experiencia para el análisis de los resultados. Aunque inicialmente los métodos de secuenciación convencional proporcionaban escasa sensibilidad, se han desarrollado nuevas plataformas que han mejorado mucho en este aspecto, con sensibilidades cercanas a las técnicas anteriores (75). Técnicas de este tipo serían: Safe-Sequencing System (Safe-Seq) (76), Ion-AmpliSeq (77), Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-seq) (78), Tagged-Amplicon deep sequencing (TAm-Seq) (79), Integrated digital error suppression-enhanced CAPP-seq (iDES-enhanced CAPP-seq) (80), sensitive mutation detection using sequencing (SiMSen-seq) (81) o Base-Position Error Rate (BPER) (75,82).

	PCR		NGS
	qPCR	dPCR (ddPCR y BEAMing)	
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Rápida • Barata • Alta especificidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta especificidad • Alta sensibilidad • Sencilla (ddPCR) 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor información • Análisis exploratorio de alteraciones no conocidas • Identifica variantes estructurales y CNV
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Sólo mutaciones puntuales • Baja sensibilidad (0.1%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Sólo mutaciones puntuales • Alto precio • Procedimiento complicado (BEAMing) 	<ul style="list-style-type: none"> • Más caro • Sensibilidad variable • Análisis bioinformático de resultados complejo

Tabla 3. Comparativa de ventajas y desventajas de las técnicas de análisis de ctDNA. PCR: Polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa); qPCR: quantitative PCR; dPCR: digital PCR; ddPCR: droplet digital PCR; NGS: Next Generation Sequencing; CNV: copy number variations (variación en el número de copias)

ctDNA como herramienta para el diagnóstico precoz

Una de las razones del mal pronóstico del adenocarcinoma de páncreas es que alrededor del 85% de los casos se diagnostica en forma de tumores no resecables. Esto sucede, en parte, por la ausencia de métodos de cribado poblacional que permitan un diagnóstico más temprano (21). A pesar de que gran cantidad de pacientes recaen tras la cirugía, ésta es la única estrategia potencialmente curativa, con gran diferencia en la supervivencia a los 5 años entre estadios localizados y avanzados (aproximadamente

20% frente a 3%, respectivamente) (83). Ante la necesidad de herramientas para la detección de mayor porcentaje de casos en fases iniciales, la biopsia líquida se postula como un candidato ideal para esta tarea, al ser un método mínimamente invasivo y altamente reproducible. No obstante, hay que tener en cuenta que para que una técnica sea válida para el diagnóstico precoz, debe tener suficiente sensibilidad para detectar el tumor en fases muy iniciales y tal especificidad que la tasa de falsos positivos sea mínima.

Aunque es posible detectar ctDNA en todos los estadios, el porcentaje de pacientes en los que lo conseguimos aumenta cuanto mayor es el estadiaje tumoral (del 30-65% en tumores iniciales, frente al 70-80% en estadios avanzados), por su mayor concentración a medida que aumenta el volumen tumoral (64,84–89). Las mutaciones en *KRAS*, presentes en un 90% de los tumores pancreáticos, y detectables ya en las lesiones premalignas (PanIN) probablemente como evento iniciador tumoral, convierten a esta alteración molecular en el candidato más estudiado y prometedor para el diagnóstico temprano (68,90–92).

En un metaanálisis de siete estudios en el que se evaluó la capacidad de distintas modalidades de biopsia líquida para diagnóstico en adenocarcinoma de páncreas, la sensibilidad y especificidad del ctDNA se estimó en un 0.64 y un 0.92, respectivamente (93). Estudios posteriores con técnicas de mayor sensibilidad, como es la ddPCR, alcanzan una sensibilidad mayor, siendo capaces de detectar la mutación de *KRAS* hasta en un 71% de los pacientes (94). Sin embargo, no hay que olvidar que existen muchos otros tumores que presentan mutaciones en este gen, así como lesiones premalignas y otras circunstancias como la presencia de lesiones benignas pancreáticas o pancreatitis crónicas en las que podríamos detectar estas mutaciones sin subyacer un tumor invasivo. Incluso, casi en un 15% de voluntarios sanos, se podría detectar mutaciones de *KRAS* en cfDNA con técnicas ultrasensibles (85). Otra cuestión al respecto es la determinación del punto de corte óptimo de la VAF para considerar la positividad, ya que se ha evidenciado que la VAF de *KRAS* es

diferente entre los distintos estadios de la enfermedad y en los casos de alteraciones no tumorales (87,89).

Para evitar los falsos positivos, que conllevarían la realización de pruebas diagnósticas invasivas no necesarias y un impacto psicológico importante en individuos sin cáncer, será necesario aumentar también la especificidad de las pruebas que utilicemos. Con este fin, algunos de los estudios han utilizado paneles de NGS que incluyan otros genes frecuentemente mutados en cáncer de páncreas como son *TP53*, *CDKN2A* o *SMAD4* (95).

Otras estrategias se han centrado en determinar otros biomarcadores asociados al ctDNA. Por ejemplo, el antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9) junto con el ctDNA permitiría distinguir lesiones quísticas benignas de adenocarcinomas con una sensibilidad de 0.82 y una especificidad de 0.81 (87); así como pancreatitis crónicas con sensibilidad de 0.98 y especificidad de 0.77 (96). Otra combinación de proteínas y ctDNA que se muestra prometedora según los resultados de un estudio es el uso conjunto del antígeno carcinoembrionario (CEA), CA 19.9, osteopontina y el factor de crecimiento hepatocitario (HGF). Mientras que utilizando sólo la detección de mutaciones de *KRAS* (codones 12 y 61) se detectaron un 30% de los casos de cáncer de páncreas, con la asociación de los cuatro biomarcadores la sensibilidad aumentó al 64% y consiguió una especificidad del 99.5% (sólo uno de los 182 controles sanos obtuvo un resultado positivo en uno de los cuatro) (92).

Más recientemente, y no sólo en adenocarcinoma de páncreas, el estudio de las alteraciones epigenómicas y los estudios de metilación en cfDNA parecen demostrar mayor capacidad para detectar y localizar de forma específica tumores en estadios iniciales (97). Así, en un subestudio prospectivo de casos y controles (más de 4000 muestras no tumorales y casi 2500 de individuos con más de 50 tipos diferentes de cáncer), el análisis de metilación de cfDNA permitió la detección y localización de estos tumores en diferentes estadios (incluyendo estadios iniciales).

En el caso concreto de adenocarcinoma de páncreas, las sensibilidades fueron de 0.63 para estadios I, 0.83 en estadio II, 0.75 en estadio III y 1 en estadio IV (98). Otros trabajos específicos de adenocarcinoma de páncreas consiguen sensibilidades y especificidades mayores al 90% con la combinación de diversos marcadores de metilación en cfDNA (99,100).

Pese a que estas estrategias son muy atractivas y esperanzadoras, ninguno de estos métodos ha demostrado todavía su utilidad en la práctica clínica para poder usarlo como herramienta de cribado poblacional, ni siquiera en grupos de alto riesgo.

ctDNA en el contexto perioperatorio y en el seguimiento

Del mismo modo que se ha logrado aislar ctDNA en pacientes con tumores en estadios iniciales, también existen estudios en los que se ha valorado su persistencia tras cirugía, su implicación en la evolución posterior y la utilidad de su monitorización.

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los pacientes en los que es posible una intervención recaerán tras la cirugía. Hasta un 60% de los casos resecables de inicio presentará la recaída durante los tres primeros años de seguimiento y un 80 % de los considerados “borderline” (resecables, pero con necesidad de resección vascular y/o tratamiento preoperatorio), lo hará durante el primer año (101,102). En este contexto, resultaría de gran interés disponer de biomarcadores que nos ayudaran en el día a día a la toma de decisiones en cuanto al tratamiento postoperatorio, nos asistieran en el seguimiento o incluso pudieran seleccionar mejor a los pacientes que vayan a beneficiarse más de la cirugía o de tratamiento preoperatorio sistémico. Teniendo en cuenta que se trata de intervenciones quirúrgicas de alta morbilidad, podríamos evitarla en aquellos casos en los que se pudiera predecir una recidiva inmediata y, por tanto, estimemos que el balance riesgo-beneficio no sea adecuado. Por ello la posibilidad de aplicar el análisis de ctDNA sería conveniente también en este marco.

Varios estudios individuales y un metaanálisis de trabajos retrospectivos que incluyó 375 pacientes coinciden en que la detección de ctDNA en muestras de plasma preoperatorias de tumores resecables son indicativas de peor pronóstico (86,103–105). De este modo, en este metaanálisis se objetivó una peor supervivencia global (SG) en los casos con ctDNA positivo preoperatorio (HR=2.3, 95% CI: 1.1-4.6), y una tendencia estadísticamente no significativa a presentar un mayor riesgo de recidiva (HR=1.96, 95% CI: 0.65-5.9) (105). En esta misma línea, en un estudio con 105 pacientes en el que se analizó la presencia de la mutación de *KRAS* en ctDNA empleando ddPCR, las diferencias en supervivencia libre de recaída (SLR) y SG fueron claramente distintas entre los pacientes con ctDNA positivo frente a negativo: 6 vs. 16 meses ($p < 0.001$) y 14 vs. 28 meses ($p < 0.0001$), respectivamente (103).

Así mismo, también se ha evaluado el valor pronóstico de la positividad de ctDNA en las determinaciones tras la cirugía (86,94,102,104–108). Después de una resección considerada completa y teniendo en cuenta que la vida media del ctDNA es muy corta, éste ya no se debería detectar en muestras de plasma extraídas tras la intervención. Su aislamiento en esa situación, que por analogía con el término empleado en neoplasias hematológicas se podría denominar “enfermedad mínima residual” (EMR), indica que probablemente haya una persistencia de enfermedad y, por tanto, un alto riesgo de recidiva. Esto sucede en un porcentaje de entre un 30 y un 45% de los pacientes (86,106) y, en estos casos, la tasa de recaída llega a alcanzar el 100% con los tratamientos estándar (86). Al igual que ocurre en el escenario preoperatorio, la detección de mutaciones de *KRAS* en el ctDNA tras cirugía implica una peor GS y SLP, hecho evidenciado tanto en el metaanálisis antes mencionado como en otros trabajos (86,102,107) (SG: HR=3.7, 95% CI: 1.45-9.3, y SLR: HR=2.2, 95% CI: 0.99-4.9) (105). De este modo, en los casos en los que tras la cirugía ya no se logre detectar ctDNA, el riesgo de recidiva parece menor que en los pacientes en los que persisten altos los niveles de ctDNA (86). Así mismo, se ha evidenciado lo contrario con la situación opuesta: la conversión de ctDNA negativo a positivo entre la muestra obtenida en las 24 horas antes de la intervención y la

extraída previa al alta (resuelto el proceso inflamatorio postoperatorio inmediato) también se ha identificado como factor pronóstico independiente de SG según un estudio japonés con 45 pacientes resecables (HR=9.4; 95% CI: 2–44; p=0.004) (108).

El seguimiento mediante biopsia líquida en pacientes intervenidos ha sido igualmente evaluado en diversas investigaciones como factor pronóstico y como método para detectar la recaída de forma precoz. De este modo, en un estudio con 39 pacientes en el que se les monitorizaba de forma prospectiva, la emergencia de la mutación de *KRAS* predijo peor SG (HR=54, 95% CI: 6.6-447, p<0.001) (104). Según otros trabajos, con esta técnica se detectaría la recidiva entre 84 días (102) y 6.5 meses (106) antes de por los métodos radiológicos convencionales, con una sensibilidad y especificidad en torno al 90%. Un asunto que quedaría por resolver es si la detección precoz de estas recidivas realmente tendría una implicación en la mejora de la supervivencia global.

Todas estas evidencias nos harían plantearnos claras aplicaciones en la práctica clínica rutinaria. Es posible que los pacientes resecables en los que se detecte ctDNA en determinaciones preoperatorias pudieran beneficiarse en mayor grado de estrategias de tratamiento neoadyuvante, ya que parece el subgrupo que presenta las mayores tasas de recidiva y recidivas más precoces tras la intervención. Por otra parte, aunque la variación de la VAF durante el tratamiento neoadyuvante no se ha mostrado útil en algún estudio para la toma de decisiones (89), es necesario continuar con la búsqueda de biomarcadores en este contexto, en el que en muchos casos se mantienen dudas acerca de la posibilidad de conseguir una resección completa tras el tratamiento y/o si esos pacientes van a presentar recidivas precoces. También, a la hora de determinar y monitorizar el tratamiento adyuvante de forma óptima, podría tener utilidad el ctDNA. En esta dirección, algunos indicios apuntan a que podría aportar mayor beneficio un tratamiento adyuvante más intensivo en los casos en los que hay detección de ctDNA en el postoperatorio, aunque esto

es sólo una hipótesis de algún pequeño estudio (86). Además, en los pacientes en los que, pese a estar recibiendo un tratamiento adyuvante aumentara la VAF, podría ser un indicador de desarrollo de resistencia al mismo y, por tanto, de necesidad de modificarlo o suspenderlo para evitar toxicidad.

En cualquier caso, es absolutamente imprescindible evaluar de forma reglada y dentro de ensayos clínicos la aplicabilidad de la biopsia líquida para la toma de decisiones a nivel asistencial en adenocarcinoma de páncreas localizado. En este aspecto, ya hay en marcha algunos de ellos, como son el DYNAMIC-Pancreas (ACTRN12618000335291) o el PROJECTION (NCT04246203), que sin duda aportarán datos relevantes en este escenario.

ctDNA para monitorización de tratamiento en enfermedad no reseccable

En pacientes con adenocarcinoma de páncreas localmente avanzado o metastásico, la detección de ctDNA previo al tratamiento ha demostrado tener peor pronóstico en términos de SLP y SG en varios trabajos, incluyendo estudios prospectivos fase I/II y un metaanálisis que integraba los datos de más de mil pacientes (107,109–117).

Aunque con menor evidencia que en otros tumores, también disponemos de algunos indicios que sugieren que la monitorización del ctDNA durante el tratamiento pueda servir como herramienta que nos permita evaluar la respuesta. A pesar de que en este contexto no contamos con muchas opciones terapéuticas, sabemos que la eficacia de los tratamientos es bastante limitada y que, en ocasiones, las toxicidades derivadas de los mismos hacen que el beneficio sobre el paciente será todavía menor. Adicionalmente, la interpretación radiológica de las pruebas de imagen en cáncer de páncreas puede ser compleja. A veces es muy difícil distinguir entre tumor y fibrosis, pueden existir respuestas radiológicas discordantes (reducción del tamaño de unas lesiones y aumento de otras); o incluso haber mejoría en las imágenes y empeoramiento clínico o viceversa. Por todo esto, la posibilidad de valorar la

respuesta al tratamiento de forma precoz o poder complementar la información de la evolución de la enfermedad a través de biopsia líquida, ayudaría enormemente a la toma de decisiones, evitando cirugías o tratamientos sistémicos tóxicos que pudieran ser fútiles y/o la discontinuación de terapias globalmente efectivas.

Según los resultados del subgrupo de 20 casos que recibieron neoadyuvancia y posteriormente fueron intervenidos dentro de un estudio con 59 paciente (39 fueron resecados sin tratamiento preoperatorio), la detección de ctDNA en el momento previo a la cirugía se asoció a de forma significativa peor SLP (mediana de 8 frente a 19 meses) y SG (14 meses en el grupo de ctDNA detectable y mediana no alcanzada en el subgrupo ctDNA negativizado). Del conjunto global de casos, un mayor porcentaje de pacientes en el grupo de cirugía directa presentaba ctDNA detectable antes de la cirugía (el 69%, frente al 21% de los que recibieron neoadyuvancia), y en todas las ocasiones en las que se detectaba ctDNA tras neoadyuvancia se evidenció recidiva (con una mediana de SLR de 5 meses) (102). En otro estudio en el que se realizaron determinaciones seriadas de ctDNA en 34 pacientes tratados con intención neoadyuvante, sin embargo, las variaciones en la VAF de *KRAS* en ctDNA no se correlacionaron con la resecabilidad (sí hubo correlación en el caso de las variaciones del DNA contenido en exosomas) (89).

Algunos de estos trabajos incluyen también pacientes estadio IV, del mismo modo en que se han analizado estas variaciones de ctDNA en grupos bastante uniformes de pacientes con enfermedad metastásica tratados con el mismo tratamiento. En un primer estudio asiático en el que se monitorizó la evolución de las mutaciones de 5 genes en ctDNA de 13 pacientes metastásicos, la emergencia de mutaciones de *KRAS* predecía la progresión temprana al tratamiento y, en 10 de ellos, las variaciones en los niveles de ctDNA coincidió con la respuesta radiológica al mismo (118). En la misma línea, dos estudios posteriores ofrecieron resultados similares, correlacionando las variaciones en el ctDNA en 21 (119) y 39 pacientes (104) no resecables. Así mismo, en un estudio alemán en 54 pacientes con tumores avanzados

que recibían quimioterapia de primera línea con gemcitabina y nab-paclitaxel, además de correlacionar la presencia de mutaciones de *KRAS* en la muestra basal con una peor SG, el descenso de la VAF de *KRAS* durante el tratamiento predijo la respuesta. Del mismo modo, su aumento fue capaz de prever la progresión de enfermedad con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 100% (120). Estos y otros autores han comunicado que los cambios dinámicos de ctDNA durante el tratamiento no sólo se relacionan con el volumen de enfermedad, sino también con la SLP y la SG (120,121). También existiría una asociación significativa entre la SG y la velocidad de variación de los niveles de ctDNA, con mejor SG en los casos de descenso rápido y pronunciado (122). Resultados similares se obtuvieron en un grupo homogéneo de pacientes que recibieron tratamiento de segunda línea dentro de un ensayo clínico fase II (123). Sin embargo, encontramos algún otro estudio en el que no se reprodujeron estos resultados (89).

Además de evolución de las mutaciones de *KRAS* en ctDNA, también se han evaluado variaciones en otros genes frecuentemente mutados de adenocarcinoma de páncreas con potencial utilidad para monitorizar la respuesta al tratamiento en este escenario, como *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*, *ERBB2* o *ATM* (118,124,125). En todos estos estudios, los cambios en los niveles de otros marcadores tumorales clásicos no lograron demostrar un papel claramente predictivo de respuesta. Otro punto de debate es el momento óptimo de extracción de las muestras para predecir la respuesta, ya que en los primeros siete días puede existir un aumento de la VAF no indicativa de progresión. Algunos de los estudios parecen indicar que las variaciones a los catorce días, en cambio, sí anticiparían la respuesta radiológica (120,126).

Nuevamente, hay que tener en cuenta que estos datos derivan de pequeños estudios y que, para poder llevar el uso del ctDNA a la práctica clínica como método de monitorización de respuesta a tratamiento y aplicarlo a la toma de decisiones, se necesitan ensayos clínicos prospectivos de mayor tamaño muestral para poder validar estos resultados.

ctDNA como técnica de caracterización molecular

Una de las grandes limitaciones a la hora de conseguir mejoras terapéuticas en adenocarcinoma de páncreas es la dificultad para obtener muestras tumorales de la cantidad y calidad suficiente para poder realizar estudios que identifiquen alteraciones moleculares que predigan respuesta a tratamientos dirigidos (127).

Sabemos que en este tipo tumoral existen diversas anomalías en genes “driver” que permitirían a los pacientes recibir terapias específicas, como son como *KRAS*, *CDKN2A*, *ERBB2*, *BRCA1/2*, *NTRK*, *PI3K*, *BRAF* o genes de la vía reparadora del ADN. En el marco de un estudio de caracterización molecular estadounidense en pacientes con adenocarcinoma de páncreas conocido como “Know Your Tumor” (KYT), se realizó un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos en la evolución clínica posterior de los pacientes testados. Según este trabajo, no sólo se lograron identificar este tipo de alteraciones hasta en un cuarto de los pacientes, sino que se evidenció que un tratamiento específico se traducía en mejoras en la SG (33,128). En este programa se incluyó a 1856 pacientes con adenocarcinoma de páncreas, en los que sólo en un 58% de los casos el material tumoral fue adecuado para poder realizar el análisis molecular y obtener un informe de los resultados. Un 26% de estos pacientes analizados presentaban alteraciones moleculares subsidiarias de tratamiento dirigido (189 pacientes) y, de ellos, 46 recibieron tratamiento personalizado. En este conjunto de pacientes en los que finalmente recibieron una terapia dirigida la SG fue significativamente mayor que los que recibieron terapia no guiada por resultados moleculares (2.58 vs. 1.51 años, $p < 0.0001$). Estas diferencias en supervivencia no se observaron al comparar a los pacientes que presentaban alteraciones moleculares y no recibieron tratamiento personalizado con aquellos que no presentaron ninguna anomalía accionable. Este hecho sugiere que estas alteraciones moleculares tendrían un valor predictivo y no pronóstico (33).

Por fortuna, el fenómeno de la personalización del tratamiento, aunque lentamente, parece que se está convirtiendo en una realidad en cáncer de páncreas. Olaparib, en diciembre de 2019, fue el primer fármaco dirigido aprobado para su uso específico en este tumor. El ensayo clínico fase III randomizado “POLO” demostró beneficio estadísticamente significativo en SLP frente a placebo como tratamiento de mantenimiento en pacientes metastásicos con mutación germinal de *BRCA* que no hubieran progresado a quimioterapia de primera línea basada en platino (31). Además de olaparib, algunos de los tratamientos tumor agnósticos que se están comercializando en los últimos años también brindan la posibilidad de obtener beneficio en pacientes con cáncer de páncreas. Así, los pacientes con deficiencia de los genes de reparación de los errores de apareamiento del ADN (mismatch repair) o inestabilidad de microsatélites (dMMR o MSI-H), aunque sólo representan un 1% de los tumores de páncreas, pueden beneficiarse de tratamiento con pembrolizumab y probablemente también conseguirían mejoras con otro tipo de fármacos inmunoterápicos (129,130). En este mismo contexto, entrectinib y larotrectinib, dos inhibidores tirosina quinasa activos frente a tumores sólidos que presentan fusiones de *NTRK*, podrían emplearse en los pacientes con estas alteraciones gracias a los resultados obtenidos en ensayos clínicos “tipo basket” (131,132). Otro gen cuya fusión genera grandes expectativas por su potencial implicación terapéutica es *NRG1*: en un estudio fase I con zenocutuzumab o MCLA-128 (anticuerpo biespecífico anti Her2-3) dos pacientes con adenocarcinoma de páncreas con esta fusión presentaron respuestas profundas y muy duraderas (133), por lo que está en marcha un estudio fase II con una rama dedicada a este subtipo tumoral (NCT02912949). Sin duda, el fármaco que ha abierto enormes esperanzas en torno a la posibilidad de personalizar el tratamiento en adenocarcinoma de páncreas es sotorasib. Se ha convertido en el primer inhibidor de *KRAS* que ha demostrado eficacia y excelentes resultados en el bloqueo de este gen, tradicionalmente considerado como “undruggable”, y mutado casi universalmente en cáncer de páncreas. La limitación en adenocarcinoma de páncreas es que sotorasib inhibe única y específicamente la mutación *KRAS* G12C, presente sólo en aproximadamente un 1% de los casos (134). A pesar de ello, este

avance alienta a seguir investigando en este campo con el objetivo de conseguir otros fármacos capaces de impedir la actividad de distintas mutaciones de *KRAS*, por lo que actualmente existe un gran interés en su desarrollo y están en marcha ensayos clínicos con distintos inhibidores (135–137).

Todos estos datos argumentan la necesidad e importancia cada día mayor de la realización de estudios moleculares en pacientes con adenocarcinoma de páncreas, y nos hace plantearnos alternativas al análisis en tejido tumoral. En este aspecto, la biopsia líquida se posiciona como la mejor candidata para superar este gran problema para el avance en la medicina de precisión en cáncer de páncreas. Diversas investigaciones han evaluado la concordancia entre los resultados obtenidos de la secuenciación en tejido y plasma. En este aspecto, el primer trabajo que demostró la factibilidad de detección de alteraciones moleculares en plasma mediante NGS en pacientes con tumores avanzados biliopancreáticos sin necesidad de un estudio en tejido se publicó en 2015 (138). Según un metaanálisis de 14 estudios que recogía los datos de 369 pacientes de todos los estadios, la correlación entre plasma y tumor utilizando paneles de NGS era del 31.9%. En cambio, si se consideraban sólo los trabajos que analizaban la concordancia de *KRAS*, coincidían en un 65% de los casos (139). En cuanto a las diferencias, el 38% de las mutaciones se detectaron sólo en tumor, mientras el 30% sólo en biopsia líquida, lo que podría estar relacionado con la heterogeneidad intratumoral y la emergencia de diferentes clones en el tumor primario y la metástasis. Otro estudio que incluyó pacientes con adenocarcinoma de páncreas y de colon, tras el análisis de muestras de tejido y plasma mediante un panel de 56 genes, observaba que un 78% de las alteraciones detectadas en plasma no se pudieron detectar en tumor primario. Con estos datos concluían que las muestras de plasma eran más representativas de la heterogeneidad tumoral que las tisulares (140). Adicionalmente hay que tener en cuenta los posibles cambios en la evolución temporal. Según algunos trabajos, las mutaciones en genes “driver” en adenocarcinoma de páncreas habitualmente se mantienen durante la evolución clonal. No obstante, a lo largo de la progresión tumoral se pueden añadir otras

alteraciones moleculares que serían detectables en biopsias de lesiones metastásicas, pero no en tumor primario (40,140,141). En este aspecto, el estudio del ctDNA nos daría una visión más adaptada, integrada y en tiempo real de la enfermedad tumoral, proporcionando información completa del genoma del tumor y permitiendo la identificación de cambios que ocurren con la respuesta y la progresión al tratamiento.

Algunos estudios ya han valorado la posibilidad de detectar en plasma alteraciones moleculares subsidiarias de un tratamiento dirigido y que, por tanto, pudieran sustituir el análisis molecular en tejido. De este modo, dentro del programa anteriormente comentado “KYT” también se intentó correlacionar la información obtenida de muestras de plasma con las tisulares (142). Aunque fueron capaces de identificar alteraciones sobre las que administrar tratamientos personalizados en tejido y biopsia líquida, el panel de NGS utilizado no fue capaz de lograr tal concordancia que permita afirmar que el análisis en plasma pudiera sustituir a la biopsia clásica con este objetivo. Según otro trabajo, hasta en un 75% de los pacientes con tumores avanzados presentaban al menos una alteración en el ctDNA (143) y en un estudio japonés detectaban alguna anomalía potencialmente accionable en el 29% de los casos (144). Entre estos genes se encuentran *ATM* o *PALB2* (predictivos de sensibilidad a inhibidores de PARP o sales de platino); *CCND2*, *CDK4* y *CDK6* (a inhibidores de ciclinas); *ALK*, *EGFR* o *KIT* (con posibles respuestas a inhibidores de *ALK*, *EGFR* y *KIT*, respectivamente); *AKT1*, *AKT2*, *ARID1A*, o *PIK3CA* (podrían responder a inhibidores de la vía PI3K/AKT/mTOR); o receptores de tirosina, con posible sensibilidad a inhibidores de éstos, como *AXL*, *EGFR*, *FGFR1*, *FLT3* o *PDGFRA*. Un análisis más reciente de 357 muestras de 282 pacientes con un panel de NGS que incluía 73 genes halló alteraciones con potencial terapéutico casi en la mitad de los casos (48%). Otro dato interesante de este trabajo fue que, en los 40 pacientes en los que se pudo analizar ctDNA al diagnóstico y a la progresión, en más de la mitad (23 de ellos) se detectaron alteraciones genéticas nuevas o adquiridas, ninguna de ellas presentes en el tejido basal. Este hecho hace pensar que la biopsia líquida nos daría una idea dinámica y real del panorama molecular de los pacientes (145).

Todas estas hipótesis, para poder ser aplicadas a nivel de la clínica, requieren de mayor evidencia y solidez, por lo que se necesitan más trabajos para valorar si la biopsia líquida podría sustituir la biopsia clásica.

1.4. Cultivo de organoides en cáncer de páncreas

Durante muchos años se han utilizado los cultivos celulares como modelos de estudio “in vitro” para la investigación en cáncer, incluyendo el adenocarcinoma de páncreas (146). Las líneas celulares constituyen un modelo relativamente simple, estable, homogéneo, rápido y barato para el conocimiento de la biología tumoral y testar la sensibilidad a fármacos. Sin embargo, no son capaces de representar totalmente la situación “in vivo”, ya que no es posible reproducir en ellos todas las alteraciones sub clonales ni de reflejar las interacciones con otras células del microambiente tumoral o el estroma, de inmensa importancia en el caso del páncreas. En los últimos años, algunas de estas limitaciones se han podido sobrepasar gracias al desarrollo de unos sistemas de cultivo tridimensionales llamados organoides (147).

Aunque existen varias definiciones para el término “organoide”, parece que se ha consensuado considerar como tal a aquellas estructuras tridimensionales que reúnan los siguientes cuatro criterios: 1) conservar la identidad del órgano representado; 2) presentar múltiples tipos celulares (los mismos que el órgano del que proviene), 3) exhibir algún aspecto de la función especializada de órgano y 4) autoorganizarse o estructurarse según los mismos principios intrínsecos del órgano de origen (148).

De forma muy breve y somera, tras la obtención de la muestra, para generar el organoide el tejido debe ser digerido mecánica o enzimáticamente. Posteriormente se filtra y se cultiva en un medio rico en proteínas como puede ser Matrigel®. Además, los medios de cultivo se suplementarán con diferentes sustancias como factores de crecimiento y reguladores de la diferenciación, que simularán las condiciones del lugar de origen para que no sólo se origine una estructura tridimensional, sino que represente al tejido del que proviene (149).

Recientemente se están optimizando las técnicas de generación de organoides, consiguiendo no sólo el cultivo de células madre epiteliales provenientes del tumor, sino que se han podido establecer cocultivos con células inmunes y fibroblastos asociados a tumor (150–152). De este modo, todavía se recrea mejor el escenario real, al estar representado el microambiente tumoral. Este componente es de inmensa importancia en adenocarcinoma de páncreas, tumor en el que hasta el 70-90% del volumen es estroma, lo que aparentemente es de gran impacto a nivel de eficacia de los tratamientos (153,154).

Características	Cultivo 2D	Organoides	Organoides (cocultivo)	Xenografts	Xenografts humanizados
Concordancia con paciente	+	+	++	+	++
Microambiente tumoral	-	-	+	+	++
Estabilidad	++	+	?	++	?
Tiempo establecimiento	-	++	++	-	-
Adaptabilidad	+	++	?	+	-
Costes	--	-	-	+	++

Tabla 4. Modelos *in vitro* más utilizados en la actualidad con sus principales ventajas y desventajas con respecto al resto.

Estos nuevos modelos preclínicos, cada uno con sus ventajas e inconvenientes, están suponiendo una herramienta de gran relevancia para el desarrollo de la medicina de precisión en múltiples tumores, entre ellos, el adenocarcinoma de páncreas (Tabla 4).

Establecimiento de organoides de pacientes con adenocarcinoma de páncreas

Fue en 2015 cuando se establecieron por primera vez organoides derivados de tumores de páncreas en humanos (149,155,156). Estos organoides se sometían a cultivo con Matrigel® en presencia de un medio de crecimiento intestinal, suplementado con sustancias como R-SPONDIN1 (modulador de la vía Wnt), Noggin (modulador de la vía TGF- β), factores de crecimiento fibroblástico y epidérmico, Gastrin I y antibióticos, entre otros. Su crecimiento desde lesiones tipo PanIN, malignización y metastatización tras su injerto en ratones inmunodeficientes reflejó la historia natural de la enfermedad. También se identificaron las mismas características histológicas, mutaciones “driver” típicas (*KRAS* o *SMAD4*), o características fisiológicas (como la hipoxia o marcadores epigenéticos) de los tejidos tumorales, como muestra de que representan la biología tumoral del cáncer de páncreas (155,156).

Posteriormente se han desarrollado múltiples métodos para generar organoides pancreáticos y crio preservarlos a largo plazo (149,152,157,158). Sin duda, la posibilidad de conseguir organoides multicelulares, es decir, cocultivos con otros tipos celulares de microambiente tumoral como son las células inmunes o los fibroblastos asociados al tumor (CAFs), es clave para la generación de modelos que reflejen más fielmente el comportamiento tumoral. El primer trabajo publicado de cultivo exitoso de organoides con CAFs en adenocarcinoma de páncreas, no sólo demostró que era factible, sino que identificó dos subpoblaciones diferentes de fibroblastos con distinta capacidad de generar respuesta inflamatoria y posible implicación terapéutica (159). Otro estudio posterior, además de células con estromales, se consiguió desarrollar organoides con linfocitos infiltrantes asociados al tumor (152). Más tarde no sólo se han cocultivado organoides de células tumorales e inmunes, sino que se han hecho ensayos de depleción de los elementos inmunes, modificando con ello la sensibilidad a inmunoterapia en estos modelos (160).

Los primeros organoides se generaron a partir de muestras de tumores primarios resecados, pero sabemos que la cirugía es factible en un bajo porcentaje de pacientes. En la mayoría de las ocasiones nos encontramos ante casos en los que sólo vamos a disponer de una biopsia de metástasis o de una punción con aguja fina o bloque celular procedente del tumor primario obtenido a través de ecoendoscopia. Además, lo habitual durante el curso de la enfermedad es que haya cambios en la biología de la enfermedad, derivados de la evolución clonal y/o inducidos por los tratamientos, no reflejados en la muestra de tumor primario inicial. Aunque, obviamente, la rentabilidad es mayor cuando se dispone de gran cantidad de tejido de pieza quirúrgica, en algunos estudios se ha comunicado un porcentaje de éxito de 72-87% en la generación de organoides con material procedente de biopsias de aguja fina (161,162). Menos experiencia existe con el establecimiento de éstos a partir de CTCs, pero ya se ha conseguido en cáncer de próstata (163) y pulmón (164). En tumores pancreáticos, lo más aproximado a esto fue la generación de cocultivos con células inmunes y CTCs aisladas en muestras extraídas de sangre de vena porta (165). Pese a que todavía parece lejana la posibilidad de obtener organoides de páncreas con CTCs de sangre periférica, este hecho supondría la integración de las dos herramientas de medicina de precisión empleadas en esta tesis: la biopsia líquida y los organoides.

Organoides como modelo de estudio de la biología del adenocarcinoma de páncreas

Para la caracterización molecular del tumor, el modelo de organoide clásico reproduce las características de las células tumorales ofreciendo la ventaja de una mayor pureza, ya que carece de la contaminación con células estromales e inmunes que encontramos en el tejido primario. Esto convierte a estas estructuras en una fuente de células tumorales enriquecidas. Algunos estudios han mostrado que los organoides reproducen las firmas genómicas de los tumores primarios (157,161,166), aunque parece que existen diferencias en la carga mutacional global (167). Como es esperable, al eliminar los componentes no tumorales presentes en el tejido primario,

la mayoría de las alteraciones del tumor son detectables en estos modelos (alrededor del 97%). En los organoides se suelen identificar mutaciones somáticas adicionales que probablemente en tumor primario estén en un porcentaje tan bajo que queden enmascarados por las células no tumorales propiamente dichas (161). Probablemente, por esta misma razón, también se han comunicado en algunos casos diferencias en variantes estructurales (167) y en la frecuencia alélica (mayor en organoides) (157). En estos mismos estudios se han comparado los perfiles transcripcionales entre tumor primario y organoide, con una buena correlación, por lo que parece que se mantienen los subtipos “clásico” y “basal-like” de los tumores de los que provienen (157,161,166).

Con la introducción de los cocultivos de organoides también se amplía el conocimiento del microambiente tumoral, tan estudiado y relevante en adenocarcinoma de páncreas. El estroma desmoplásico, compuesto por la matriz extracelular, células endoteliales, las células inmunes y los CAFs suponen la mayor parte del tumor y tienen gran importancia en la migración e invasión celular, así como la resistencia a los tratamientos (168). Estas relaciones se han podido objetivar en modelos de organoides, como en un estudio en el que se observó que las células esteladas pancreáticas inducían la rotura de la membrana basal y generaban invasión estromal, a través de metaloproteinasas de matriz (169). Así mismo, se ha descrito que en cocultivos de monocitos, CAFs y células tumorales pancreáticas se genera un aumento de citoquinas inmunosupresoras que provoca una inhibición de células T, responsables del ambiente de inmunosupresión tumoral (154). Otro estudio no solo demostró que las células supresoras mieloides promovían el crecimiento tumoral y suprimían la proliferación de linfocitos T citotóxicos, sino que postulaban que su depleción podía conseguir sensibilidad a inmunoterapia (160).

Del mismo modo, se han realizado estudios en organoides para intentar evaluar la transformación metastásica. En trabajos en los que se han generado organoides de metástasis de distintas localizaciones y en diferentes momentos de la evolución de la

enfermedad, las sensibilidades a distintos fármacos fueron cambiando, como reflejo de la generación de resistencias a los mismos. En algún caso, aunque se mantenía el perfil mutacional, se identificaron cambios en el número de copias, que podían representar variaciones epigenéticas responsables de las resistencias (161). No sólo se han investigado con organoides los cambios moleculares, sino que también se ha intentado conocer mejor el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), ya que en estas estructuras tridimensionales es posible observar la capacidad invasiva. De esta forma, se ha constatado la pérdida de E-cadherina como evento desdiferenciador en modelos de organoides (170) o el papel de *SMAD4* y la vía de TGF β en la adquisición de un fenotipo invasivo (171,172).

Uso de organoides como test funcional para la identificación de tratamientos personalizados en cáncer de páncreas

Globalmente el pronóstico del adenocarcinoma de páncreas es malo, si bien es cierto que existe cierta heterogeneidad tanto en la evolución natural como en la respuesta a los tratamientos. A pesar de que conocemos distintos subgrupos genómicos con potenciales comportamientos y sensibilidades terapéuticas diferentes (42,44,173), en el momento actual sólo disponemos de un fármaco que podríamos considerar “personalizado” con eficacia demostrada en ensayo clínico fase III: Olaparib, para pacientes con mutaciones de *BRCA1/2* (31). Este pequeño avance, junto con los datos indirectos del beneficio de la terapia personalizada en adenocarcinoma de páncreas (33), animan a continuar con la investigación en este campo. Uno de los obstáculos ha sido que los modelos preclínicos tradicionales probablemente no han podido reflejar suficientemente lo que sucede en el paciente, por lo que muchos fármacos prometedores en fase preclínica no han llegado a demostrar eficacia clínica. Con el uso de los cocultivos de organoides se prevé minimizar estos problemas e incluso llegar a individualizar tratamientos, hecho que ya parece evidenciarse en diversos tumores digestivos, con una sensibilidad del 100%, especificidad del 93% y valores predictivos positivo y negativo de un 88% y un 100% respectivamente (174).

Varios trabajos han evaluado la quimiosensibilidad en modelos de organoides de adenocarcinoma de páncreas, intentando compararla con la respuesta en los pacientes (157,161,175,176). En uno de los primeros se testó en 66 organoides la sensibilidad a gemcitabina, paclitaxel, irinotecan, 5-FU y oxaliplatino en monoterapia, con importantes diferencias entre ellos, que parecían reproducirse con la evolución que habían presentado los pacientes de los que provenían. En los casos en los que se disponía de organoides en diferentes puntos de la evolución de la enfermedad de un mismo paciente, también se pudo evaluar la quimiorresistencia en fases más avanzadas (161). En otro estudio que evaluó los esquemas gemcitabina asociado a nab-paclitaxel y FOLFIRINOX en organoides, ratones y pacientes también obtuvo resultados comparables en los tres escenarios (157).

La pureza de células tumorales que encontramos en los organoides nos permite identificar alteraciones moleculares frente a las que podemos actuar con tratamientos dirigidos, lo que también se ha evaluado en algunos de estos estudios. Por ejemplo, en uno de los trabajos antes mencionados, en la mitad de los casos resistentes a quimioterapia se encontraron fármacos dirigidos, como Sunitinib, a los que presentaban sensibilidad. También hubo efecto antitumoral en casos de quimiosensibilidad y, como era esperable, en aquellos en los que se detectaron alteraciones específicas, como amplificaciones de *ERBB2* o mutaciones de *EGFR* (sensibles a afatinib), pérdida de *PALB2* (olaparib) o mutación de *PIK3CA* (sensible a everolimus) (161). Un estudio, en el que se testó la sensibilidad en 24 organoides de adenocarcinoma de páncreas con un panel de 76 drogas, detectaron respuestas similares con fármacos que actuaban a nivel de las mismas vías moleculares o procesos biológicos. Entre otros, el efecto de gemcitabina con afatinib, se vio que dependía del estado de *MAP3K1* y *PIK3R1*: mayor sensibilidad en los casos con alteraciones del número de copias de estas quinasas “downstream” del receptor de *EGFR* (175).

Con el desarrollo de los cocultivos multicelulares es probable que también se explore la utilidad de fármacos que modulen el microambiente tumoral para mejorar la eficacia de tratamientos que hasta ahora se han considerado fútiles (152). En este sentido, ya se han generado modelos de organoides en los que se ha conseguido sensibilizar a anticuerpos antiPD-1/PDL-1 deplecionándolos de células mieloides, responsables de bloquear la respuesta citotóxica antitumoral en condiciones normales (160).

Aunque todos estos resultados son bastante preliminares y todavía alejados de la práctica, ya se han publicado los resultados iniciales de un estudio piloto llevado a cabo en el Dana Farber Cancer Institute: el estudio HOPE. En él se incluyeron 76 pacientes, de los que en 12 de ellos se lograron generar de forma prospectiva de organoides aptos para testar fármacos (16%). Globalmente, se evidenció una alta concordancia entre las respuestas clínicas y la sensibilidad a los fármacos en los modelos *in vitro* (177). Todo esto anima a continuar avanzando en investigación con organoides para mejorar la selección de fármacos que posteriormente pudieran ser llevados a su administración en ensayos clínicos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La secuenciación del exoma completo en biopsia líquida al diagnóstico en pacientes con adenocarcinoma de páncreas metastásico y la generación de organoides a partir de tejido tumoral permiten identificar alteraciones moleculares subsidiarias de tratamiento personalizado.

Objetivos:

1. Describir las alteraciones genómicas en las muestras de tejido parafinado al diagnóstico de pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado mediante el estudio de secuenciación del exoma completo.
 - 1.1. Distinguir las anomalías germinales y somáticas, patogénicas o potencialmente patogénicas.
 - 1.2. Identificar aquellas alteraciones que puedan responder a tratamiento dirigido o predecir diferente respuesta a tratamientos.
2. Describir las anomalías genómicas de pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado al diagnóstico mediante el estudio de secuenciación del exoma completo en muestras de plasma (ctDNA).
 - 2.1. Determinar las alteraciones patogénicas o potencialmente patogénicas, reconocer aquellas que puedan tener impacto en el tratamiento e identificar las vías implicadas en el desarrollo tumoral o con valor pronóstico.
 - 2.2. Evaluar la concordancia molecular entre tejido y plasma y, con ello, explorar la utilidad del estudio de ctDNA como método de caracterización de la heterogeneidad intratumoral.
3. Valorar la utilidad clínica de la detección y monitorización en plasma mediante ddPCR de mutaciones de *KRAS* como biomarcador en pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado.
4. Explorar la génesis de modelos de organoides de adenocarcinoma de páncreas humano a partir de muestras obtenidas en piezas de pancreatectomía.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

En este proyecto se incluyeron prospectivamente a pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de páncreas en cualquiera de los estadios clínicos (I-IV) en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) entre junio de 2016 y agosto de 2022. Los criterios de inclusión fueron: tener al menos 18 años de edad y capacidad de decidir; diagnóstico citológico o histológico de adenocarcinoma de páncreas; y reunir las características habituales del centro para poder recibir un tratamiento quirúrgico y/o quimioterápico activo. Se excluyeron pacientes con enfermedades oncohematológicas malignas activas o durante los 5 años previos que puedan alterar o enmascarar el análisis de los resultados. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HCUV (2017.118) y los pacientes incluidos proporcionaron su consentimiento por escrito para participar en el proyecto.

Durante este periodo de aproximadamente 4 años, se reclutaron 184 pacientes con todos esos requisitos, que podemos dividir en 2 grupos (figuras 2 y 3):

A. Pacientes considerados en el comité multidisciplinar como resecables de inicio: Se tomó una primera muestra de sangre basal el día de la intervención (antes de la misma). En el acto quirúrgico se obtuvo tejido tumoral para su parafinado y análisis patológico rutinario, así como muestra de tejido fresco para generación de organoides y almacenamiento en biobanco. Durante el seguimiento se recogieron sucesivas muestras de plasma: entre 4 y 8 semanas tras intervención, para detección de enfermedad mínima residual (antes de iniciar quimioterapia adyuvante, si se administra); y coincidiendo con las pruebas radiológicas de seguimiento (habitualmente TAC), según práctica estándar. Los pacientes en los que el diagnóstico de irresecabilidad se realizó intraoperatoriamente o aquellos en los que hubo una recaída durante el seguimiento, continuaron con el manejo del grupo de pacientes B.

B. Pacientes irresecables/metastásicos: La muestra basal de sangre y de tejido fue la del diagnóstico. Posteriormente se realizaron extracciones de plasma aproximadamente cada 2 meses, en las analíticas más cercanas a las pruebas de imagen de valoración de respuesta a tratamiento de acuerdo a la práctica clínica habitual.

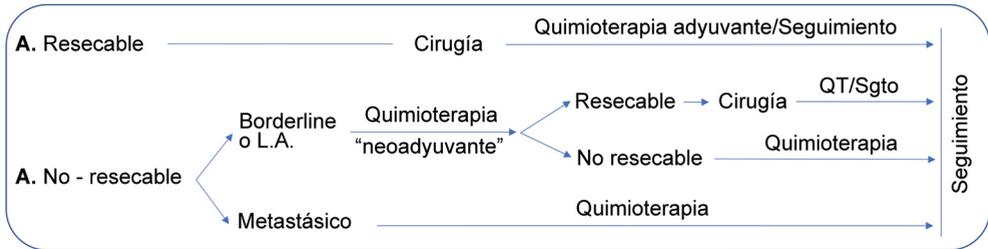


Figura 2. Subgrupos de pacientes incluidos en el estudio y esquema de su manejo clínico según resecabilidad. L.A.: Localmente avanzado, QT: quimioterapia, Sgto: seguimiento.

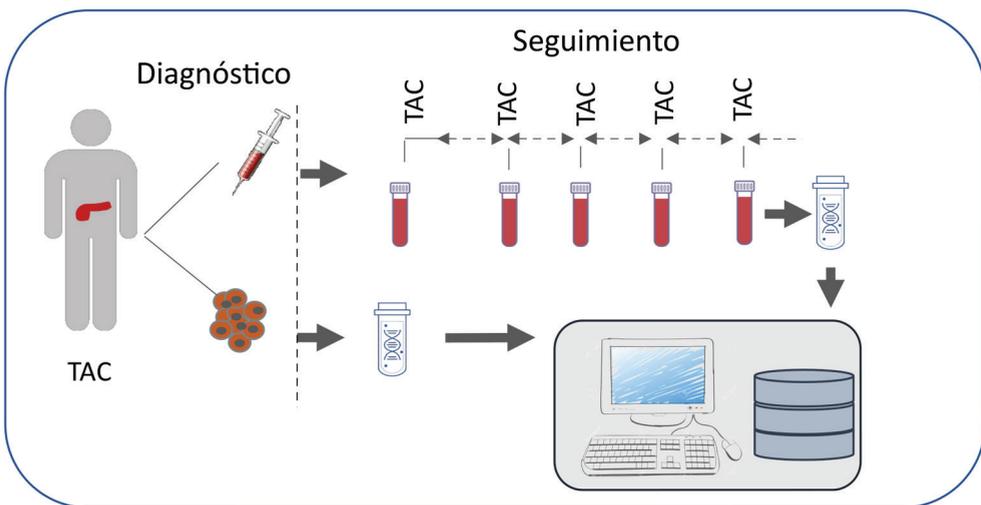


Figura 3. Esquema de recogida de muestras de tejido y plasma

En estos pacientes se recogieron las variables clínicas clásicas y patológicas que constan en la histórica clínica del hospital relacionadas con el pronóstico y la evolución de esta enfermedad, manejando toda la información de una forma confidencial siguiendo las normas de buenas prácticas clínicas y los principios éticos legales. Entre otras, las variables más relevantes registradas fueron: sexo; edad al diagnóstico; estadiaje clínico (cTNM); tipo y grado histológico; analítica

al diagnóstico (hemograma, bilirrubina y CA 19.9 fundamentalmente); valor de CA 19.9 en cada valoración de respuesta (considerado como normal <27 U/mL); esquema e intención de quimioterapia (neoadyuvante, adyuvante o paliativo); respuesta al tratamiento según criterios RECIST 1.1 (respuesta parcial, estabilidad de enfermedad o progresión de enfermedad); tiempo a la progresión o recaída y supervivencia; fecha de exitus o pérdida de seguimiento. En el caso de pacientes que se intervinieron se recogió la fecha de cirugía, el estadiaje patológico (pTNM) y el grado de afectación de márgenes (R0, R1 o R2). Las características más importantes de los pacientes reclutados se recogen en la tabla 5.

Características		Todos los pacientes n=183 (%)	
Mediana de edad (rango)		67 (37-83)	
Sexo	Hombres	96 (52.5)	
	Mujeres	87 (47.5)	
Grupo	A*	44 (24.1)	
	B	Borderline/LA	59 (32.2)
		Metastásico	80 (43.7)
Cirugía	Sí	De inicio*	37 (20.2)
		Tras neoadyuvancia	18 (9.8)
	No		128 (70)
Tipo de material tumoral disponible	Citología (solo)	69 (37.7)	
	Biopsia o bloque celular	114 (62.3)	
Exitus**	Sí	132 (71.7)	
	No	51 (28.3)	

Tabla 5. Principales características de los pacientes de la serie (todos los estadios).

LA: localmente avanzado.

*7 pacientes irresecables o metastásicos intraoperatoriamente.

** Seguimiento hasta diciembre de 2022.

La mediana de edad en nuestra serie de pacientes con adenocarcinoma de páncreas, teniendo en cuenta todos los pacientes reclutados en cualquiera de los estadios de la enfermedad, fue de 67 años. Algo más de la mitad de ellos, el 52.5%, fueron hombres. En cuanto a la situación de enfermedad al diagnóstico, en 44 casos (24.1 % de la serie) se consideró que se trataba de tumores resecables en ese momento, aunque en 7 de ellos en el acto quirúrgico se evidenció enfermedad metastásica o irresecabilidad que contraindicó este tratamiento. En 139 pacientes (75.9% de la serie) el tratamiento inicial fue la quimioterapia. De los 59 pacientes considerados no resecables de inicio, pero sin enfermedad metastásica, en 18 casos se consiguió practicar una cirugía de intención curativa, lo que representa un 30.5% de este subgrupo de tumores (borderline o localmente avanzados) y un 9.8 % de toda la serie. En el momento del corte de datos, el 71.7% de los pacientes había sido exitus, con una mediana de seguimiento de 361 días (rango 9-2616), considerando el tiempo de seguimiento desde la fecha del diagnóstico hasta el día de exitus, pérdida de seguimiento o fecha de corte de datos. A tener en cuenta que el paciente con mayor tiempo de seguimiento es un paciente diagnosticado previamente al inicio del estudio, al que incluimos a partir del momento de la recaída.

Con respecto a los datos epidemiológicos generales de cáncer de páncreas, la mediana de edad de nuestra serie es un poco inferior a la estimada, probablemente porque solo incluimos pacientes candidatos a tratamiento activo y habitualmente los pacientes de edad más avanzada presentan más comorbilidades que los hacen no aptos para tratamiento. También observamos un porcentaje ligeramente mayor de pacientes quirúrgicos, lo que posiblemente se deba a que nuestro centro es unidad de referencia para cirugía pancreática.

3.2. Selección de pacientes con adenocarcinoma de páncreas estadio IV

Para la caracterización molecular mediante la secuenciación del exoma completo en las muestras de sangre antes de iniciar tratamiento y tejido al diagnóstico, se

seleccionaron los 37 primeros pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de páncreas avanzado incluidos en el proyecto de forma prospectiva y correlativa entre mayo de 2016 y abril de 2020 (cohorte de descubrimiento). De estos mismos pacientes se evaluó la presencia de la mutación de *KRAS* mediante ddPCR en las muestras de plasma al diagnóstico y en los subsiguientes seguimientos coincidiendo con las valoraciones de respuesta (en los casos en los que obtuvimos muestras). Las principales características de estos pacientes se resumen en la tabla 6.

Como cohorte de validación interna de los resultados obtenidos del estudio mediante ddPCR de este subgrupo de pacientes, se estudiaron las mutaciones de *KRAS* por esta misma técnica muestras al diagnóstico y en la primera evaluación de respuesta del resto de pacientes avanzados incluidos en nuestro biobanco desde mayo de 2020 a agosto de 2022 (43 pacientes). El seguimiento de estos pacientes se incluye hasta 24 de febrero de 2023.

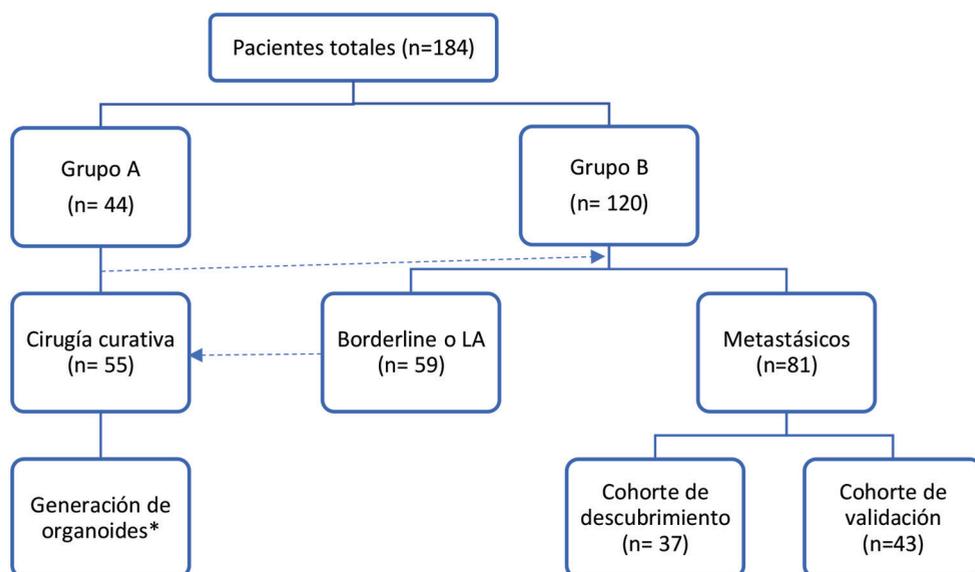


Figura 4. Esquema de los grupos y cohortes del proyecto y pacientes analizados. En líneas discontinuas se representa el flujo de pacientes entre grupo A y B (pacientes que intraoperatoriamente se consideraron irresecables o metastásicos) y al contrario (casos que, tras tratamiento quimioterápico con respuesta, se pudieron intervenir). * El inicio de recogida de tejido en fresco para generación de organoides es posterior al inicio del proyecto (no se recogió tejido para generar organoides de todos los pacientes).

Características		Pacientes estadio IV de cohorte de descubrimiento: n=37 (%)
Mediana de edad (rango)		65.5 (37-82)
Sexo	Mujer	14 (37.8)
	Hombre	23 (62.2)
ECOG	0	3 (8.1)
	1	24 (64.9)
	2	8 (21.6)
	3	2 (5.4)
CA 19.9 al diagnóstico	≤ 27 U/mL	3 (8.1)
	>27 U/mL	34 (91.9)
Localización de metástasis al diagnóstico	Hígado	25 (67.6)
	Peritoneo	11 (29.7)
	Pulmón	10 (27)
	Otros	3 (8.1)
Número de localizaciones metastásicas	1	28 (75.7)
	2	5 (13.5)
	Más de 2	4 (10.8)
Tratamiento de primera línea	Ninguno*	1 (2.7)
	Gemcitabina	7 (18.9)
	Gemcitabina + Nab-paclitaxel	25 (67.6)
	FOLFIRINOX	4 (10.8)
Número de líneas de tratamiento recibidas	0	1 (2.7)
	1	18 (48.7)
	2	10 (27)
	3	8 (21.6)
Mediana de supervivencia ** (rango)		249 (27 - NA)

Tabla 6. Características de los pacientes estadio IV de la cohorte seleccionada para la secuenciación (cohorte de descubrimiento).

ECOG: performance status según escala ECOG.

* paciente que se estimó subsidiaria de tratamiento de primera visita, con rápido deterioro.

** En días; una de la paciente de la serie sigue viva (rango superior de mediana de supervivencia no alcanzada = NA).

Las características de los pacientes de la cohorte de validación interna se resumen en la siguiente tabla:

Características		Pacientes estadio IV de cohorte de validación interna: n=43 (%)
Mediana de edad (rango)		63 (43-83)
Sexo	Mujer	23 (53.4)
	Hombre	20 (46.5)
ECOG	0	2 (4.7)
	1	31 (72.1)
	2	9 (20.9)
	3	1 (2.3)
CA 19.9 al diagnóstico	≤ 27 U/mL	6 (14)
	>27 U/mL	37 (86)
Localización de metástasis al diagnóstico	Hígado	29 (67.4)
	Peritoneo	13 (30.2)
	Pulmón	7 (16.3)
	Otros	8 (18.6)
Número de localizaciones metastásicas	1	30 (69.8)
	2	10 (23.3)
	Más de 2	3 (7)
Tratamiento de primera línea	Gemcitabina	6 (14)
	Gemcitabina + Nab-paclitaxel	24 (55.8)
	FOLFIRINOX	12 (27.9)
	Otros	1 (2.3)
Número de líneas de tratamiento *	1	19 (44.1)
	2	18 (41.9)
	3	6 (14)
Mediana de supervivencia ** (rango)		263 (9-NA)

Tabla 7. Características de los pacientes estadio IV de la cohorte validación interna de los resultados de ddPCR en la cohorte de descubrimiento.

* en el momento del análisis (24 de febrero de 2023), 10 pacientes continúan vivos, cinco de ellos en tratamiento de primera línea, con opciones de recibir otros tratamientos.

** En días, teniendo en cuenta sólo los pacientes que han fallecido en el momento del análisis (rango superior de mediana de supervivencia no alcanzada = NA)

3.3. Procesamiento de las muestras de tejido y extracción de ADN/ARN

Las muestras tumorales estudiadas procedieron del tejido parafinado y archivado en el Servicio de Anatomía Patológica del HCUV a partir de las biopsias diagnósticas de los pacientes. Se realizaron cortes de aproximadamente 3 μm , teñidos con hematoxilina-eosina para valorar el área tumoral, así como el porcentaje de celularidad en cada una de las muestras analizadas.

Para la extracción de ADN total del tejido fijado en formaldehído e incluido en parafina se partió de 8 secciones de 5 μm , procesadas mediante el kit comercial AllPrep® DNA/RNA FFPE kit (Qiagen, CA, USA), que nos permite obtener de manera simultánea ADN y ARN. Para ello se siguieron las instrucciones del fabricante, lo cual consistió en un tratamiento con proteinasa K tras el desparafinado de las muestras. Con ello se obtuvo una fase líquida o sobrenadante, de la que se extrajo el ARN y una fase sólida o precipitado, con el que siguió el protocolo para la extracción de ADN. Mediante una purificación en columnas, la fase sólida se trató con diferentes tampones incluidos en el kit (ATL, AL, y etanol) y finalmente se eluyó el ADN total con agua libre de DNasa. En el caso de la purificación del ARN se siguieron igualmente las instrucciones del fabricante, utilizando en este caso etanol y las soluciones del kit específicas para esta sustancia (*RLT*, *FRN*, *RDD* y *RPE*). Para la elución se utilizó agua libre de RNasa.

Las muestras de ADN procedente de tejido FFPE se conservaron a -20°C hasta su posterior uso y el ARN obtenido del protocolo se almacenó a -80°C para su conservación.

3.4. Procesamiento de las muestras de plasma y extracción del ADN circulante

Las muestras de sangre se recogieron en tubos Vacutainer con anticoagulante K2 EDTA de 6 ml, procesadas en las dos primeras horas tras la extracción para evitar la

degradación del ADN. Para la separación del plasma de las células sanguíneas, las muestras de sangre fueron sometidas a dos centrifugaciones a temperatura ambiente a 1600 x g durante 20 minutos. Tras ello, las muestras de plasma se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento para la extracción del ADN libre circulante.

La extracción de ADN libre circulante (cfDNA) se realizó a partir de 4 ml de plasma mediante la utilización del “QIAmp® Circulating Nucleic Acid kit” (Qiagen, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El cfDNA extraído se almacenó a -20°C para su conservación.

3.5. Cuantificación y análisis de la calidad del ADN de las muestras de plasma y tejido

Tanto el ADN tumoral extraído de las parafinas, como el ADN germinal (ADNg) de las células blancas y el cfDNA del plasma se cuantificó mediante fluorometría utilizando el equipo Glomax Discovery (Promega Inc, USA) utilizando el kit QuantiFluor dsDNA Kit, el cual permite la cuantificación de ADN de doble cadena

La calidad y concentración total del ADN extraído del tumor incluido en parafina y del cfDNA se determinó con el 4200 TapeStation System (Agilent, Santa Clara, California, USA) en combinación con los kits comerciales Genomic DNA ScreenTape Analysis y Cell-free DNA ScreenTape Analysis (Agilent, Santa Clara, California, USA), respectivamente.

3.6. Secuenciación del exoma completo de muestras de sangre y tejido.

Para la secuenciación del exoma de cada una de las muestras de ADN (gDNA, tDNA y cfDNA) se utilizó la aproximación SureSelect XT HS V6 + UTR (Agilent Technologies, USA) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Esta estrategia constó de un paso inicial de fragmentación mecánica mediante sonicación hasta conseguir fragmentos de 150-200 pb, este paso no fue necesario en el caso de cfDNA debido a su tamaño. El primer paso en común de los distintos ADN procesados fue la reparación de extremos y adición de una adenina (A) para permitir la ligación de los adaptadores para el marcaje molecular. En este paso se incorporan índices únicos por muestra e identificadores de molécula única (UMI) en cada uno de los extremos de los fragmentos, lo que nos permitió, por un lado, la correcta identificación de las lecturas de cada muestra y, por otro lado, la eliminación de ruido de fondo en el análisis bioinformático posterior. Seguidamente se llevó a cabo una serie de purificaciones y amplificaciones para generar unas librerías de tamaños comprendidos entre 200-400pb.

Con la librería preparada y con el tamaño esperado se realizó un paso de captura mediante hibridación por sondas, las cuales contenían todas las regiones identificadas como exónicas a lo largo del genoma. El contenido de este panel tiene un tamaño total de 36Mb. Los fragmentos capturados fueron purificados usando las propiedades del complejo biotina-estreptavidina y amplificado una última vez para aumentar la cantidad de material a secuenciar. Tras un paso final de purificación con bolas magnéticas las librerías finales fueron evaluadas mediante Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) con el kit High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, USA) para confirmar el tamaño y la cantidad de las mismas.

Estas librerías se secuenciaron en la plataforma de secuenciación NovaSeq 6000 (Illumina Inc, USA) con una configuración de 150x2, con una cobertura media de 139.5 X para gDNA, 102.53 X para tDNA y 425.43X para el cfDNA.

3.7. Análisis de las mutaciones de *KRAS* mediante ddPCR en las muestras de plasma

Dado el alto porcentaje de tumores de páncreas que presentan la mutación de *KRAS*, se llevó a cabo la evaluación de mutaciones de este gen en el plasma

al diagnóstico y en los seguimientos mediante la técnica de alta sensibilidad PCR digital en nanogotas o droplet digital PCR (ddPCR).

Las reacciones de ddPCR se realizaron utilizando el sistema QX200 AutoDG Droplet Digital PCR (ddPCR) System, que incluye el generador automático de gotas de emulsión, el lector QX200 Droplet Reader, que contabiliza la fluorescencia positiva y negativa, y el QuantaSoft software que se utiliza para calcular la concentración del ADN diana. Además, la reacción de ddPCR precisa de la utilización de un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler y el PX1 PCR Plate Sealer para el termosellado de las placas.

Para cada muestra, la reacción de ddPCR se produce en un volumen total de 21 μl que corresponden a 10 μl del *mix* de reacción *ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)*, 2 μl de la sonda específica (en este caso la *ddPCR™ KRAS G12/G13 Multiplex Screening kit* (BioRad, Hercules, California, USA)) y 1 μl de agua. Se completa hasta 21 μl con el ADN del paciente disuelto en agua. La placa se introduce en el *Automated Droplet Generator™* donde obtendremos el ADN compartimentado en hasta 20.000 emulsiones de agua y aceite y las nanogotas generadas se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos. Tras el sellado de la misma en el *PXI PCR Plate Sealer* durante 3 segundos a 180°C, se introdujeron en el termociclador *C1000 Touch™ thermal Cycler* donde se lleva a cabo la reacción de amplificación por PCR.

Finalizada la reacción de PCR, la placa se colocó en el lector *QX200 Droplet Reader*, que analiza cada gota de manera individual, lee su fluorescencia y usa un sistema de detección por colores. El análisis de fluorescencia se realizó con el software informático *QuantaSoft™*, que utiliza un algoritmo de Poisson para determinar la concentración de partida del ADN diana en copias/ μl (Copias por nanogota = $-\ln(1 - p)$, donde p = fracción de nanogotas positivas (número de nanogotas positivas/nanogotas totales)).

Cada reacción fue revisada manualmente y para cada una de ellas se estableció un umbral de amplitud de fluorescencia que clasificó cada uno de los eventos. En esta tesis doctoral fijamos el límite de eventos positivos para VAF, para poder considerar como positiva para una mutación a la muestra, en 3 eventos positivos VAF. Cada muestra se analizó una sola vez. Aquellas muestras que tras el análisis de los resultados generaron dudas sobre la existencia o no de alteraciones en el gen *KRAS* fueron analizadas por duplicado. Cada placa se diseñó de modo que incluía dos controles negativos, uno sin ADN molde y uno con ADN molde sin variaciones en la secuencia de interés, y un control positivo, con ADN molde con variaciones en la secuencia de interés.

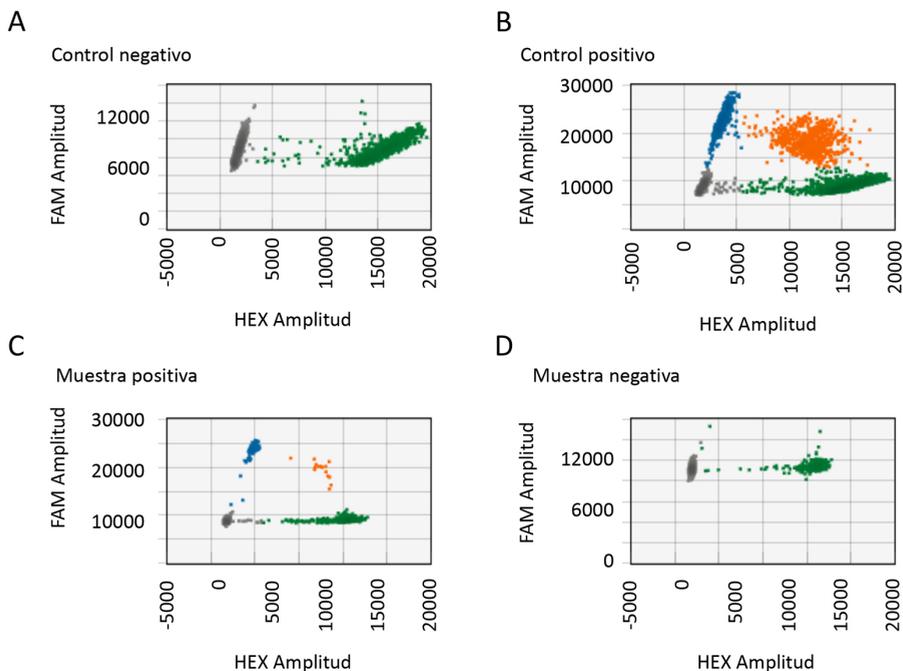


Figura 5. Análisis de ddPCR mediante el software de análisis QuantaSoft de Bio-Rad. La sonda multi-*KRAS* está marcada con dos fluoróforos: VAF para la detección de la mutación, resaltado en azul en los gráficos de dispersión, y HEX para los loci WT, marcado en verde. Las marcas naranjas indican eventos con ambas etiquetas, no seleccionados debido a la inespecificidad. A) Control negativo de un tejido previamente probado en el laboratorio, representado como no mutado para *KRAS* (CTT147). B) Control positivo de un tejido previamente probado en el laboratorio, representado como mutación para *KRAS* (CTT143). C) Biopsia líquida de un paciente con cáncer de páncreas mutado para *KRAS*. D) Biopsia líquida de un paciente con cáncer de páncreas no mutado para *KRAS*

3.8. Organoides

Desde noviembre de 2019, en todos los pacientes sometidos a intervención quirúrgica, además de obtención de tejido tumoral pancreático procedente de las pancreatectomías para su almacenaje en fresco en biobanco, se seleccionó muestra para intentar el establecimiento de organoides.

En el periodo comprendido entre noviembre de 2019 y junio de 2022 se incluyeron en el proyecto 28 pacientes con adenocarcinoma de páncreas que fueron intervenidos con intención curativa, con o sin tratamiento neoadyuvante previo. Además, de un caso en el que se realizó una resección parcial tumoral, se remitió tejido tumoral en fresco pese a tratarse de una cirugía paliativa. De estos 29 casos, fue posible organizar el circuito completo para la recolección de tejido tumoral con el objetivo de generar organoides en 18 de ellos (figura 6).

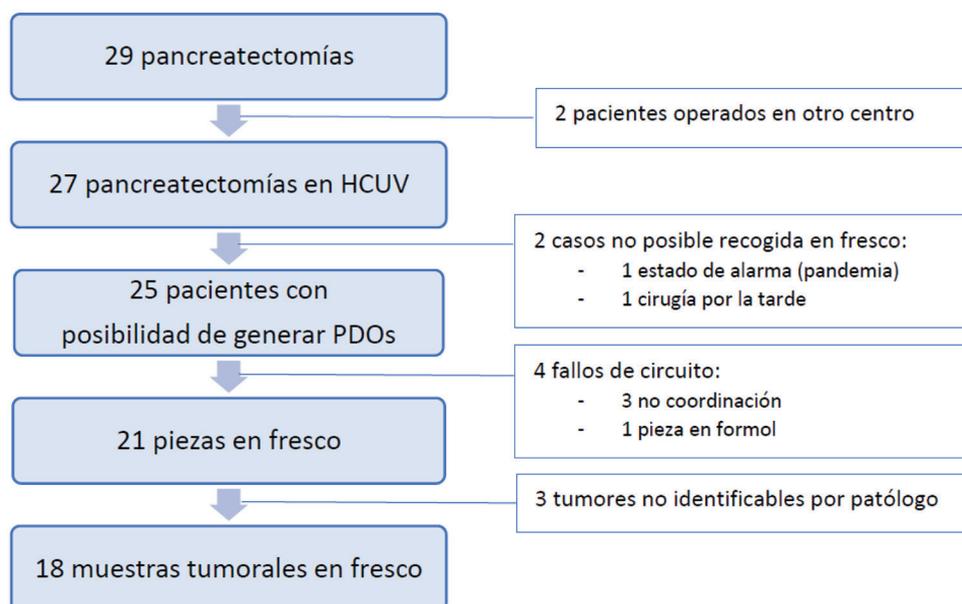


Figura 6. Diagrama de flujo de pacientes intervenidos.

Tras la resección del tumor mediante pancreatomectomía por cirujanos especializados, las piezas se remitieron en fresco al Servicio de Anatomía Patológica para su apertura y selección de tejido tumoral por los patólogos de referencia de patología pancreática. Una pequeña porción del tumor se utilizó para la generación de organoides, otra para su conservación en fresco en Biobanco y el resto de la pieza se incluyó en formol para su posterior procesamiento siguiendo el protocolo de Anatomía Patológica rutinario para diagnóstico asistencial.

3.8.1. Generación de organoides de adenocarcinoma de páncreas a partir de tejido de pancreatomectomía.

Para el establecimiento de organoides derivados de pacientes (PDOs) con adenocarcinoma de páncreas estimados como resecables tras revisión en comité multidisciplinar, se siguió el protocolo de generación de organoides de nuestro laboratorio.

Tras la selección en fresco de un área de la pancreatomectomía considerada como tumoral por el patólogo experto, las muestras se recogieron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para su procesamiento. En los casos en los que fue posible, se recogieron también muestras del tejido sano adyacente al tumor.

Después de realizar lavados seriados con PBS, las muestras se incubaron durante 20 minutos con PBS al 2X de antibióticos: Penicilina/Estreptomina (Gibco, ref: 15140-122) y Primocina (InvivoGen, ref: ant-pm-1). A continuación, las muestras se disgregaron mecánicamente con la ayuda de un bisturí. Con los fragmentos obtenidos se realizó una digestión enzimática con Liberasa TL (Roche, ref: 05401020001) a una concentración de 0,3U/mL durante 90 minutos a 37°C.

La solución resultante de esta digestión se pasó por un filtro de 70µm para descartar los restos de tejido no digerido y se realizó un conteo celular mediante

cámara de Neubauer. A continuación, se plaquearon entre 200.000 y 300.000 células por pocillo, en un volumen final de 40µL al 50% del hidrogel *Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract* (RGF BME) *Type 2* (R&D Systems, ref: 3533-005-02) y de las células resuspendidas en medio basal (MB), utilizando placas P24W antiadherentes (Sarstedt, ref: 833922500). Se incubaron en la estufa de cultivos durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ y, una vez solidificados los domos de BME con las células, se añadió el medio *IntestiCult™ Organoid Growth Medium* (Stemcell Technologies, ref: 06010) para la formación de los organoides.

Durante el cultivo de los PDOs, se cambió el medio cada 48 horas, monitorizando su evolución al microscopio. Una vez alcanzado un tamaño y densidad de organoides elevados, se disgregaron con tripsina TrypLE™ Express 1X (Gibco, ref: 12605010) y se plaquearon en un mayor número de pocillos, de forma análoga a lo explicado anteriormente, aumentando así la densidad de organoides progresivamente en cada pase.

Con la finalidad de coleccionar los organoides para posteriormente poder realizar diferentes estudios y constituir un biobanco de PDOs de páncreas, se criopreservaron empleando el medio de congelación Bambanker™ (Nippon Genetics, ref: BB02) y se almacenaron a -120°C en tanque de nitrógeno líquido en el Biobanco de INCLIVA. Así mismo, también se recogieron en *pellets*, que se guardaron a -20°C, para extracción de ADN y ARN para su posterior secuenciación.

Para la utilización de las muestras almacenadas, los criotubos se descongelaron en medio basal y, tras centrifugar y eliminar el medio de congelación, se plaquearon de forma análoga a la descrita anteriormente para su mantenimiento en cultivo.

Cada organoide se nombró con las siglas PTO (*Pancreatic Tumor Organoid*) o PNO (*Pancreatic Normal Organoid*), en función de si se generaron a partir de tejido pancreático tumoral o normal, seguidos del número correlativo de muestra recogida y procesada.

3.8.2. Caracterización morfológica de organoides.

Para la caracterización morfológica, tras la eliminación del medio de cultivo, se disgregaron los domos de BME con PBS frío, y se recogieron los organoides. Una vez centrifugados para eliminar el PBS, se fijaron con formaldehído (PFA) en solución al 4% en PBS incubando durante 45 minutos a 4°C. A continuación, sobre el sedimento de organoides fijados, se añadieron 4 gotas de histogel (Thermo Scientific, ref: HG-4000-012) con la ayuda de una pipeta Pasteur, formándose un bloque de histogel que se transfirió a un cassette de histología y se introdujo en un procesador automático (LEICA ASP6025), el cual deshidrata y parafina la muestra.

Finalmente se realizaron cortes de 3µm de las muestras parafinadas en microtomo y se montaron en cristales portaobjetos. Tras secarlos a 37°C, se realizó la desparafinación y tinción con hematoxilina-eosina (Dako, ref: CS700, CS701) de los cristales de forma automática en el equipo PT Link (Dako, ref: PT10126) en el departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina.

Estas mismas tinciones se realizaron en los tejidos tumorales parafinados recogidos de acuerdo a la práctica clínica habitual y, tanto los cortes procedentes de los cultivos de organoides como el tejido tumoral, fueron revisados por patólogos expertos dedicados a patología pancreática.

3.8.3. Caracterización molecular de organoides y tejido tumoral pareado mediante WES.

La extracción de ADN de los organoides se realizó a partir de un *pellet* de densidad alta utilizando el kit QIAmp® DNA Micro Kit (Qiagen, ref: 56304), siguiendo las indicaciones del fabricante, mientras que la extracción de sus respectivos tejidos tumorales parafinados se llevó a cabo a partir de 4 secciones de 10µm cada una, empleando el kit QIAmp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, ref: 56404).

Por otro lado, la extracción de ARN se realizó de forma análoga, utilizando los kits RNeasy® Micro Kit (Qiagen, ref: 74004) y RNeasy® FFPE Kit (Qiagen, ref: 73504), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de las mismas cantidades de muestras arriba descritas.

La cuantificación y evaluación de la calidad del ADN genómico y del ARN extraídos se llevó a cabo mediante fluorescencia empleando TapeStation (Agilent Technologies) en la Unidad de Medicina de Precisión de INCLIVA.

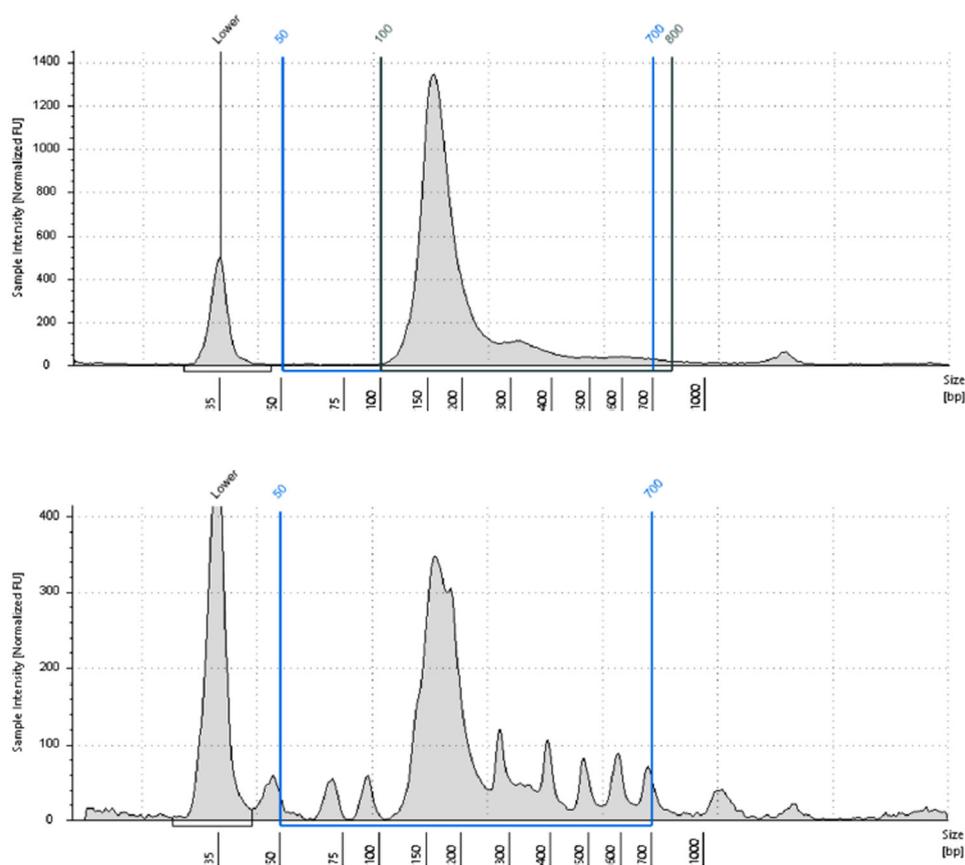


Figura 7. Gráficos de evaluación y control de calidad de las muestras ctDNA tras su análisis mediante TapeStation. En el gráfico A observamos los resultados de una muestra óptima para el análisis, frente a la muestra del gráfico B, con una calidad que impide su análisis o nos ofrecería unos resultados erróneos.

3.8.4. Ensayos de sensibilidad a fármacos

Para la realización de ensayos de sensibilidad a distintos fármacos, los organoides se disgregaron totalmente hasta llegar a célula única, incubándolos con tripsina TrypLE™ Express 1X (Gibco, ref: 12605010) entre 10 y 15 minutos a 37°C. Se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer y se plaquearon 3000 células por pocillo en un volumen final de 5µL al 50% de BME, en placas P96W antiadherentes (Sarstedt, ref: 83.3925.500). Las placas se incubaron a 37°C durante 10 minutos para la formación de los domos de BME y a continuación, se añadieron 100µL de medio de cultivo por pocillo.

Tras 48 horas de incubación en estufa de cultivos (37°C, 5% CO₂), cuando los organoides se habían formado de nuevo, se retiró el medio y se añadieron los diferentes fármacos diluidos en el mismo medio. Se testaron al menos 5 dosis distintas por fármaco y cada concentración por triplicado. Además, se dejaron pocillos como control en cada placa, a los que se les añadió medio sin ningún tratamiento.

Las placas se incubaron con los tratamientos durante 120 horas y se midió la viabilidad celular con el reactivo CellTiterGlo3D® (Promega, ref: G9681) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, se añadieron 100µL de reactivo por pocillo empleando una pipeta multicanal. Tras resuspender, se incubaron las placas en oscuridad a temperatura ambiente durante 25 minutos y, a continuación, se midieron los valores de luminiscencia en el lector de placas (Fluorskan, Thermo Fisher).

Cada ensayo se realizó al menos dos veces, con un triplicado técnico para cada condición, y se tomó el valor de la media de ellos. Las representaciones gráficas se llevaron a cabo empleando el *software* GraphPad Prism (versión v. 8.2.1).

3.9. Análisis bioinformático de los resultados de secuenciación del exoma.

Los datos crudos fueron evaluados con la herramienta FastQC v0.11.8. Se eliminaron adaptadores y las lecturas con baja calidad con fastp v0.20.1. Las lecturas filtradas se mapearon frente al genoma humano GRCh38 con bwa v0.7.17. Se realizó un post-procesado de los ficheros BAM generados con

PicardTools v2.18.6 y con la estrategia de buenas prácticas de GATK v4.2.0.0. Se utilizó UMI-tools v1.0.1 para extraer las secuencias de los UMI y eliminar las lecturas duplicadas. La mediana de cobertura obtenida en muestras de sangre fue de 139.5 X, en tejido de 102.53 X y en plasma de 425.43X. El criterio de calidad se estableció en superar el 75% de las bases cubiertas a 50x para las muestras de sangre, 75% bases cubiertas a 100x para tejido y 75% bases cubiertas a 250x para las muestras de plasma. Posteriormente, se llevó a cabo la llamada de variantes con una combinación de GATK v4.2.0.0.0 y LoFreq v2.1.5.

En las muestras parafinadas, se estableció un límite para la detección de variantes del 5%, mientras que para las muestras de biopsia líquida se estableció un límite de 0.1%. La anotación de las variantes se llevó a cabo integrando la información proporcionada por el software Variant Effect Predictor sobre la base de datos de Ensembl v.105 y la base de datos de OncoKB a través del uso de sus APIs (interfaces de programación de aplicaciones).

Las variantes clasificadas como “Oncogenic”, “likely oncogenic” y “predicted oncogenic” por OncoKB fueron revisada manualmente para minimizar la ocurrencia de falsos positivos.

Además, estas variantes se agruparon en distintas categorías según una clasificación propia de INCLIVA:

- Grupo I:
 - Ia: variantes revisadas con tratamiento dirigido según OncoKB
 - Ib: Variantes no revisadas con tratamiento dirigido según OncoKB
- Grupo II: Variantes oncogenic/likely oncogenic/predicted oncogenic revisadas por Oncokb
- Grupo III: Variantes oncogenic/likely oncogenic/predicted oncogenic en genes clasificados como TSG/oncogen con frecuencia poblacional inferior al 1% o sin valor en esta columna de frecuencia poblacional (“-”) y que no tengan un impacto (columna IMPACT) LOW o MODIFIER.
- Grupo IV: variantes oncogenic/likely oncogenic/predicted oncogenic en genes no clasificados como TSG/oncogen, con impacto (columna IMPACT) que no sea LOW ni MODIFIER, y con una frecuencia

poblacional inferior al 1%. También se incluyen en este grupo las variantes oncogenic/likely oncogenic/predicted oncogenic con un impacto (columna IMPACT) que sea LOW pero en zonas de splicing y con una frecuencia poblacional inferior al 1%.

- Grupo V: resto variantes oncogenic/likely oncogenic/predicted oncogenic con frecuencia poblacional superior al 1%.
- Grupo VI: resto de variantes que no cumplen los anteriores requisitos.

Estas variantes se reportaron en los genes correspondientes a la HALLMARK de cáncer de páncreas descrita en MSigDB (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP_PANCREATIC_ADENOCARCINOMA.html) (178). Mediante la selección de esta firma se pretendió observar el perfil molecular de la cohorte de estudio en los 30 genes con mayor influencia en el desarrollo y evolución de tumores pancreáticos. Los genes incluidos en esta HALLMARK se recogen en la tabla 8.

<i>AAGAB</i>	<i>BMPRIA</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CDC73</i>	<i>CDKN2A</i>
<i>COL14A1</i>	<i>CTRC</i>	<i>EPCAM</i>	<i>FAN1</i>	<i>KRAS</i>	<i>MLH1</i>
<i>MLH3</i>	<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>NTHL1</i>	<i>PALB2</i>	<i>PALLD</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>PMS1</i>	<i>PMS2</i>	<i>RABL3</i>	<i>RNF43</i>	<i>RPS20</i>
<i>SEMA4A</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SPINK1</i>	<i>STK11</i>	<i>TGFBR2</i>	<i>TP53</i>

Tabla 8. Genes pertenecientes a la HALLMARK de cáncer de páncreas.

3.10. Análisis estadístico

La descripción de la cohorte y los distintos subgrupos se realizó mediante parámetros estadísticos descriptivos. Para las variables demográficas, clínicas y valores de laboratorio continuas se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad. Los datos con distribución normal se informaron como media y aquellos con distribución no normal se informaron como mediana. Las comparaciones entre las cohortes se llevaron a cabo utilizando pruebas t de Student, en los datos de distribución normal, o pruebas de Kruskal-Wallis, en aquellos de distribución no normal. Los datos categóricos se informaron como n (%) y las comparaciones se analizaron mediante la

prueba de Chi-cuadrado (χ^2). Para los análisis de supervivencia se empleó la regresión de Cox, comparando las curvas de Kaplan-Meier con un Log-Rank test. Se utilizó el ajuste del p-valor según el método de Benjamini-Hochberg (179) para comparar las curvas de supervivencia.

El grupo de 80 pacientes metastásicos se dividió en 2 cohortes temporalmente consecutivas. En la primera de ellas, o cohorte de descubrimiento, se calculó el punto de corte óptimo para la reducción de la VAF de *KRAS* utilizando estadísticas de rango máximamente seleccionadas para el tiempo transcurrido hasta la progresión de la enfermedad. Este valor se utilizó en la segunda cohorte (cohorte de validación) para crear la curva Kaplan Meier de tiempo hasta la progresión. Posteriormente se incluyó este biomarcador en un análisis multivariable con selección de variable de regresión de Cox basado en el criterio de información de Akaike (180) considerando edad (<65 vs \geq 65 años), ECOG (0,1 o \geq 2), presencia o no de metástasis hepáticas y nivel de CA 19.9 (superior o inferior al límite superior de la normalidad, o alto vs bajo, respectivamente).

Todos los análisis se llevaron a cabo con el software R (versión 4.0.2 (181)), con el punto de corte de significación estadística en 0.05. Se utilizó MaxStat (182) para estadísticas de rango máximamente seleccionadas; y Survival (183) y Survminer (184) para la generación de las curvas Kaplan Meier y el cálculo estadístico de log-rank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Descripción de las alteraciones genómicas de las muestras de tejido parafinado de pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado mediante el estudio de secuenciación del exoma completo (objetivo 1).

Para la caracterización genómica de los tumores de pacientes con adenocarcinoma de páncreas realizamos la secuenciación del exoma completo de las muestras de parafina de las biopsias obtenidas al diagnóstico, en aquellos casos en los que conservamos material en cantidad y calidad adecuada.

De los 37 pacientes incluidos, en 15 de ellos el diagnóstico se obtuvo a partir de muestras de citología y en 4 casos más el tejido parafinado se empleó en su totalidad durante el estudio anatomopatológico inicial o en el proceso asistencial del paciente y, por tanto, no disponíamos de tejido. De los 18 pacientes con tejido para extracción del tDNA y generación de las librerías, 3 de ellos no reunieron los parámetros de calidad o cantidad necesarias para la secuenciación, por lo que obtuvimos resultados de 15 muestras de parafina. En el momento del análisis bioinformático, en uno de los casos no teníamos la información de secuenciación de la muestra de células mononucleadas para poder filtrar las anomalías germinales y en 4 casos adicionales dichos resultados no alcanzaron los criterios de calidad establecidos por nuestra unidad para su análisis. En conclusión, 10 de las muestras de tejido parafinado se consideraron óptimas para el análisis final de resultados de secuenciación (figuras 8 y 9).

De estas 10 muestras, nueve de ellas eran tejido obtenido a partir de biopsia con aguja gruesa hepática. La otra muestra de tejido válida (TT-PDAC-029) se trataba de una biopsia endoscópica de duodeno, infiltrado por el tumor primario. Las cuatro muestras de parafina con calidad insuficiente provenían de biopsias de metástasis hepáticas.

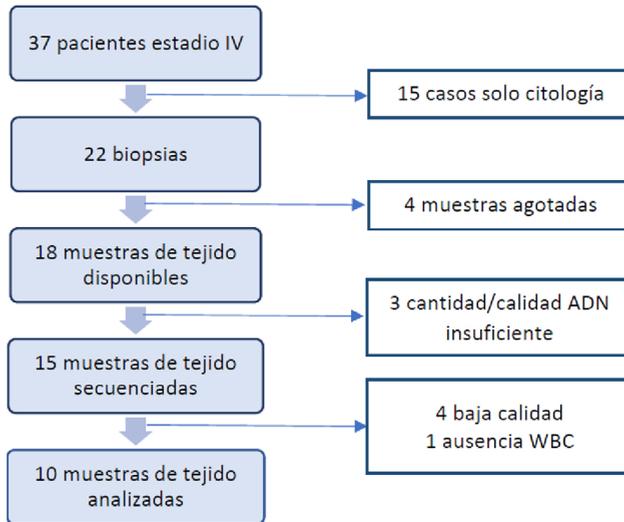


Figura 8. Esquema de selección de muestras de tejido parafinado para el análisis de resultados de secuenciación. WBC= white blood cells (células mononucleadas de sangre periférica)

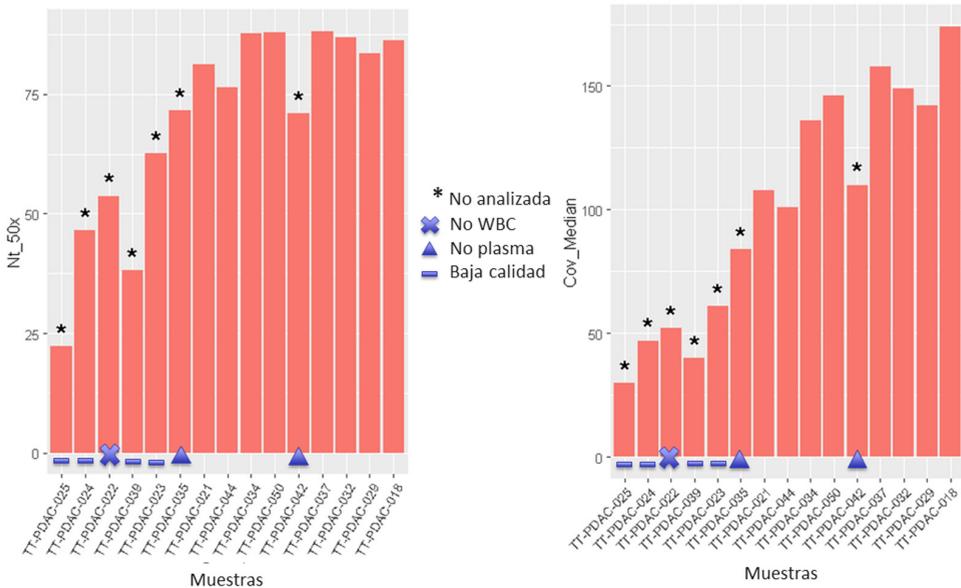


Figura 9. Gráficas representativas de la calidad de las muestras de parafina. A la izquierda se representa el porcentaje de bases cubiertas a 50x. En el gráfico de la derecha, la cobertura media de dichas muestras. Con un asterisco en la parte superior se señalan las muestras no analizadas por no alcanzar los parámetros de calidad/cantidad de ADN preestablecidos. En la base, con un aspa se marca el caso en el que no disponíamos células blancas del paciente, con un triángulo los pacientes sin plasma disponible para análisis y con una raya las muestras de calidad insuficiente.

1.1. Distinción de las anomalías germinales y somáticas, patogénicas o potencialmente patogénicas.

Tras la secuenciación del ADN obtenido de los tejidos tumorales (tDNA), realizamos un análisis bioinformático de los resultados de la misma. Se reconocieron tanto las mutaciones puntuales o “Single Nucleotide Variant” (SNV) como las variaciones en el número de copias o “Copy Number Variation” (CNV), patogénicas o potencialmente patogénicas según oncoKB, de los 30 genes recogidos en la firma de genes de la hallmark de adenocarcinoma de páncreas, tal y como se describe detalladamente en el apartado correspondiente de material y métodos.

Para podernos asegurar de que estas alteraciones eran propias del tumor (somáticas) y no se trataba de anomalías **germinales** fue necesario en análisis de las células mononucleadas de las muestras de sangre periférica de los pacientes. La secuenciación del exoma completo de estas células de los casos de los que realizamos WES en plasma y tejido nos llevó a la detección de mutaciones en línea germinal con potencial patogénico en tres de los casos. Teniendo en cuenta que el total de pacientes en los que finalmente analizamos WES de células blancas fueron 29, esta cifra supone que un 10.3% del grupo presentaron alguna mutación germinal. Dichas alteraciones se recogen en la tabla 9.

Gen	Variante germinal	Consecuencia	Nº de pacientes	VAF
<i>TP53</i>	p.Leu348Ser	<i>Missense</i>	1	48.98 %
<i>RECQL4</i>	p.Cys525AlafsTer33	<i>Frameshift</i>	1	45.45 %
<i>AXIN1</i>		<i>Splicing</i>	1	55.83 %

Tabla 9. Mutaciones germinales potencialmente patogénicas. Mutaciones detectadas en los genes de las células mononucleadas con potencial patogénico. Nº: número, VAF: Frecuencia alélica de la variante.

Una vez excluidas estas mutaciones germinales, el resto de alteraciones detectadas se podían considerar propias del tejido tumoral o **somáticas**. Todas las muestras tumorales presentaban, al menos, una variante patogénica en alguno de los genes descritos en la hallmark PDAC. En el 90% de ellas detectamos mutaciones puntuales del gen *KRAS* (9 de 10 casos). Si nos centramos en los genes, el siguiente gen con mayor frecuencia de mutaciones fue *TP53*, mutado en el 50% de los tumores, seguido de *CDKN2A* (20% de las muestras). *BRCA1*, *MLH3* y *PALLD* los encontramos mutados únicamente en uno de los diez tejidos parafinados (figura 10).

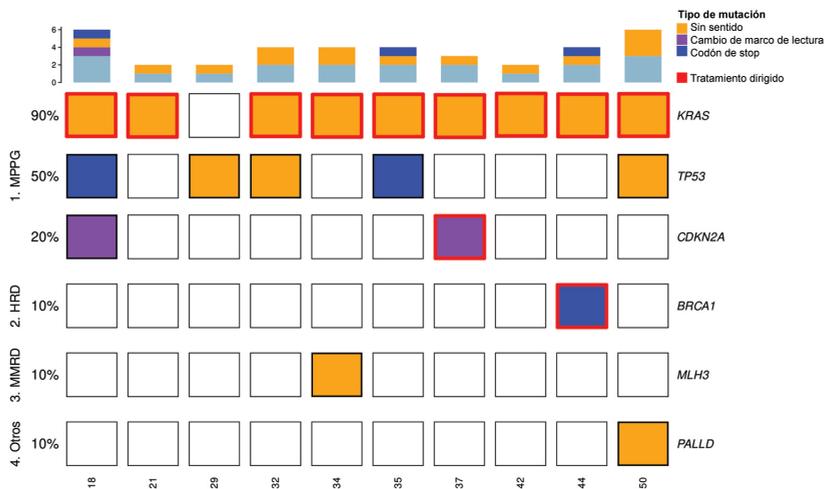


Figura 10. Gráfico de las SNVs detectadas en las muestras de tumor parafinadas. Representación de las mutaciones oncogénicas del tejido de los 10 pacientes con muestra adecuada. Cada columna corresponde al tumor de un paciente. A la derecha aparecen los genes en los que se han detectado mutaciones y, a la izquierda, el porcentaje de muestras con mutaciones para ese gen y la vía a la que pertenece cada uno o el grupo en el que podríamos incluirlo: genes clásicos descritos como con mayor porcentaje de mutaciones en cáncer de páncreas (genes más prevalentes en adenocarcinoma de páncreas o MPPG), genes relacionados con deficiencia de recombinación homóloga (HRD), con deficiencia en el sistema de reparación de apareamiento erróneo (MMRD) y otros. Las casillas están coloreadas en los casos en los que en el tumor se detecte alguna mutación, con distinto color según el tipo: amarillo en mutaciones *missense* o sin sentido, lila para mutaciones *frameshift* o que implican cambio de marco de lectura y azul aquellas que generan un codón de stop. Aquellas con tratamiento potencial según OncoKB aparecen resaltadas con el reborde en rojo. En la parte superior, el gráfico de barras indica el número de mutaciones puntuales en estos genes por muestra de parafina.

Si consideramos no sólo las mutaciones, sino también las variaciones de número de copias (CNV) *KRAS* y *TP53* siguen siendo los genes en los que detectamos mayor

número de alteraciones de este tipo, en un 20% de las muestras. En el caso de *KRAS*, las dos muestras presentan una ganancia o amplificación del número de copias, mientras que para *TP53* detectamos una amplificación y una delección. También hallamos variaciones de número de copias en dos pacientes en los genes *SMAD4* (delecciones en ambos casos) y *AAGAB* (una delección y una amplificación). El resto de genes pertenecientes a la hallmark de páncreas en los que detectamos CNVs fue sólo en una de las muestras y, predominantemente, se trató de amplificaciones. Estos datos aparecen representados en la figura 11.

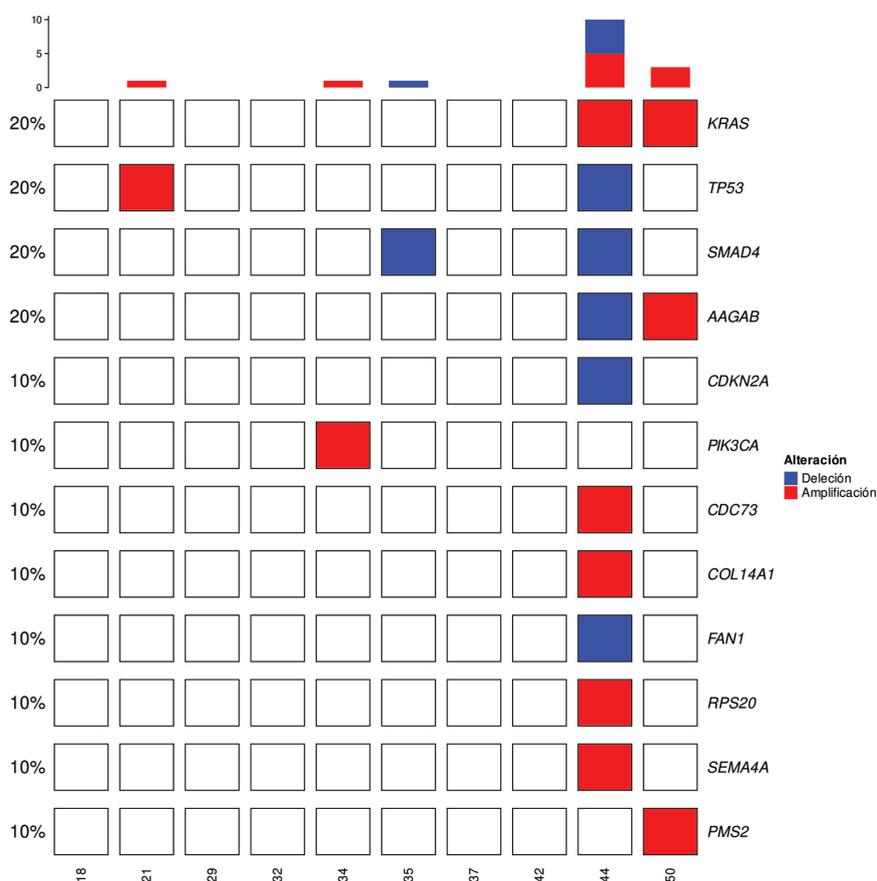


Figura 11. Gráfico de las variaciones de número de copias (CNV) patogénicas o potencialmente patogénicas en los genes de la hallmark de páncreas de las muestras de tejido. Cada columna corresponde al tumor de un paciente. A la derecha se enumeran los genes en los que se han detectado CNVs (delecciones en azul y amplificaciones en rojo). A la izquierda se indica el porcentaje de muestras con mutaciones para ese gen. En la parte superior, el gráfico de barras indica el número de alteraciones por muestra, con el mismo código de colores.

1.2. Identificación de aquellas alteraciones que puedan responder a tratamiento dirigido o predecir diferente respuesta a tratamientos.

Más allá de describir la genómica tumoral de las muestras de tejido, intentamos reconocer qué alteraciones moleculares podrían ser predictoras de respuesta a tratamientos, de modo que pudieran tener una aplicación práctica para el manejo de los pacientes.

Basándonos en la información recogida en la base de datos OncoKB, detectamos hasta once mutaciones subsidiarias de tratamiento dirigido en siete genes diferentes, con un porcentaje de frecuencia de variación alélica de, al menos, un 5%. (tabla 10).

GEN	MUTACIONES ACCIONABLES (n)	% DE PACIENTES	VAF (MEDIANA)	CONSECUENCIA	TRATAMIENTO
<i>KRAS</i> ^{G12D}	5	50	10	<i>Missense</i>	MRTX1133
<i>BRCA1</i>	1	10	6	<i>Stop, Missense</i>	Rucaparib/ Niraparib/ Talazoparib/ Olaparib
<i>ARID1A</i>	1	10	8	<i>Frameshift, Stop</i>	Taxemetostat/ PLX2853
<i>CDKN2A</i>	1	10	10	<i>Stop, Missense</i>	Abemaciclib/ Ribociclib/ Palbociclib
<i>MTOR</i>	1	10	6	<i>Missense</i>	Temsiroimus/ Everolimus
<i>EZH2</i>	1	10	7	<i>Missense</i>	Tazemetostat
<i>SF3B1</i>	1	10	7	<i>Missense</i>	H3B-8800

Tabla 10. Mutaciones detectadas en tejido tumoral con potencial accionabilidad según OncoKB. En las columnas, de izquierda a derecha, podemos ver: el gen en el que se detecta la alteración accionable (en caso de *KRAS*, la variante G12D), el número de mutaciones accionables, porcentaje de pacientes que presenta la alteración, la mediana de VAF detectada, el tipo de mutación o variante y los potenciales tratamientos dirigidos que se podrían valorar. VAF: Variante de fracción alélica.

En la mitad de las muestras de parafina hallamos la mutación de KRAS G12D, mutación frente a la que existen moléculas en investigación clínica con resultados esperanzadores, como como MRTX1133. El resto de mutaciones identificadas con potencial terapéutico sólo las detectamos en casos individuales, en los genes *BRCA1*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MTOR*, *EZH2* y *SF3B1*.

Discusión del objetivo 1

La obtención de, al menos, material de citología proveniente de tumor primario o metástasis sigue siendo en la actualidad una maniobra necesaria de confirmación del diagnóstico de adenocarcinoma de páncreas antes de cualquier actuación terapéutica, sobre todo para administrar tratamiento sistémico. La dificultad de acceso al tejido de tumor primario, altamente rico en estroma y con bajo porcentaje de celularidad tumoral, complica en muchas ocasiones este proceso. Más compleja todavía es la obtención de tejido en cantidad y calidad suficiente que permita realizar estudios moleculares para caracterizar este tumor más allá del diagnóstico histológico (41,42). Pese a que en el momento actual el tratamiento de pacientes con tumores avanzados se basa predominantemente en el empleo de terapia citotóxica, si queremos avanzar en el campo de la medicina personalizada en cáncer de páncreas, es fundamental conseguir material que nos permita realizar estos análisis moleculares. En nuestra serie, al igual que en la mayoría de trabajos de adenocarcinoma de páncreas (33), el porcentaje de pacientes en los que dispusimos de tejido tumoral óptimo para análisis molecular fue muy bajo: de los 37 pacientes con tumores metastásicos de la cohorte de descubrimiento, sólo en 10 de ellos se obtuvieron resultados moleculares válidos, lo que representa un 27% de los casos.

Antes del análisis de las alteraciones moleculares propias del tumor, es necesario conocer y filtrar aquellas que están presentes en todas y cada una de las células del individuo y, por tanto, serían alteraciones germinales y no tumorales como tal. Para ello se analizan las células blancas mononucleadas provenientes de muestras

de sangre del paciente. En el caso del adenocarcinoma de páncreas avanzado, este estudio de las mutaciones en línea germinal se ha convertido en los últimos años en un procedimiento con aplicación en la práctica clínica, ya que el único tratamiento dirigido aprobado para esta patología es Olaparib, cuyo beneficio en SLP se ha demostrado en pacientes con mutaciones germinales de *BRCA1/2* (no somáticas) (31). En nuestra serie no detectamos ninguna alteración germinal en este gen, aunque sí en otros tres: *TP53*, *RECQL4* y *AXINI*. El primero de ellos y más conocido, el gen supresor tumoral *TP53*, cuando está alterado en línea germinal se relaciona con el síndrome de Li Fraumeni. En los pacientes portadores de estas mutaciones, no sólo existe mayor predisposición al desarrollo de cáncer de páncreas, sino también otros tumores como sarcomas, carcinoma de mama, tumores cerebrales, renales, adrenales o tumores hematológicos. La identificación de esta mutación germinal y, por tanto, esta predisposición, puede resultar útil para individuos portadores cara a la prevención y el diagnóstico precoz de estos tumores (185). En el caso de nuestro paciente, era conocedor de la mutación, por antecedentes familiares que habían llevado al estudio de la familia, pero había decidido no realizarse el seguimiento intensivo propuesto por la Unidad de Consejo Genético. *RECQL4* se trata de un gen que codifica para una DNA helicasa de la familia RecQ, implicada en la modulación de segregación cromosómica y se ha asociado a un aumento de desarrollar cáncer (186). Por su parte, *AXINI* codifica una proteína citoplasmática reguladora negativa de la vía WNT1 y sus mutaciones se han relacionado con desarrollo de carcinomas hepáticos, meduloblastoma, vejiga, ovario y cáncer gástrico (187,188). En cualquier caso, a la hora de evaluar estas alteraciones germinales, hay que ser muy cuidadoso con las implicaciones que pueden tener estos hallazgos, ya que pueden tener consecuencias no sólo para el paciente, sino también para familiares, por lo que cualquier hallazgo no conocido debe manejarse en el entorno de una Unidad especializada de Consejo Genético.

En los casos en los que pudimos realizar un estudio de WES en las muestras de tejido parafinado, el panorama mutacional somático obtenido fue similar al descrito

previamente en este tipo tumoral. En el 90% de las muestras detectamos mutaciones en *KRAS*, gen oncogénico alterado en la inmensa mayoría de estos tumores. Le siguieron en frecuencia las mutaciones en *TP53*, identificadas en la mitad de las muestras de tejido, y de *CDKN2A*, presentes en 2 casos (20% de las muestras). El resto de las mutaciones oncogénicas pertenecientes a la hallmark PDAC encontradas, sólo aparecían en una de las muestras. A diferencia de lo reportado en la literatura, en los tejidos parafinados estudiados no hallamos mutaciones en *SMAD4*, el cuarto gen mutado con más frecuencia en este tipo tumoral, y el porcentaje de muestras con mutaciones en *TP53* y *CDKN2A* fue algo menor al descrito en los principales trabajos de adenocarcinoma pancreático (80 y 60%, respectivamente) (38). Probablemente este hecho se deba a dos factores: el escaso número de muestras analizadas y que prácticamente todas ellas provienen de tejido metastásico, mientras que en los estudios de secuenciación de referencia se estudia material de tumor primario proveniente de piezas de pancreatectomía.

El estudio de secuenciación mediante WES del tejido tumoral no sólo describe las alteraciones oncogénicas presentes en las muestras tumorales, sino que también nos permite identificar aquellas con un potencial tratamiento dirigido. Al analizar el exoma completo y no centrarnos en un panel génico limitado a un listado de genes, pudimos identificar todas las alteraciones con posibles tratamientos personalizados recogidos en la base de datos OncoKB. En el caso concreto de nuestro trabajo, hasta la mitad de pacientes presentaron la mutación de *KRAS* G12D. Tras el éxito terapéutico de los inhibidores de *KRAS* G12C (189–192), existe un gran avance en el desarrollo de fármacos dirigidos frente a otras mutaciones de *KRAS*, tradicionalmente considerado como no accionable. Aunque en el momento actual todavía no disponemos de fármacos accesibles en la práctica clínica, los inhibidores de *KRAS* G12D muestran resultados preclínicos prometedores (135–137,193) y ya hay en marcha estudios con estos fármacos (NCT05737706, NCT05533463, NCT05846516 o NCT06040541), lo que ampliaría las opciones terapéuticas en gran número de pacientes con cáncer de páncreas. El resto de alteraciones detectadas, aunque en menor porcentaje de casos,

también abrirían las puertas a posibles tratamientos dirigidos en este tumor en el que las opciones terapéuticas son tan escasas. En cualquier caso, habría que tener en cuenta que estas posibles terapias dirigidas no disponen de evidencia clínica para su uso en la práctica habitual y, por tanto, su aplicación se limitaría a ensayos clínicos.

2. Descripción de las anomalías genómicas de pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado que no han recibido tratamiento mediante el estudio de secuenciación del exoma completo en muestras de plasma (ctDNA) (objetivo 2).

Al igual que hicimos con las muestras parafinadas de la biopsia tumoral diagnóstica, para la caracterización del genoma de los pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado llevamos a cabo la secuenciación del exoma completo en las muestras de plasma recogidas antes de iniciar tratamiento sistémico. En 7 de los 37 pacientes, no se obtuvo el ADN en suficiente cantidad o calidad para poder realizar el estudio de secuenciación. Adicionalmente, en un paciente no fue posible estudiar las células mononucleadas para poder discernir entre las alteraciones en el ADN germinal o somático. Por tanto, finalmente pudimos caracterizar el ctDNA de 29 pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado no pretratados. Tal y como se hizo con los tejidos parafinados, nos centramos en las alteraciones con potencial patogénico en los treinta genes incluidos en la hallmark de PDAC.

2.1. Determinación de las alteraciones patogénicas o potencialmente patogénicas, reconocimiento de aquellas que puedan tener impacto en el tratamiento e identificación de vías implicadas en el desarrollo tumoral o con valor pronóstico.

En estos 29 pacientes, tras excluir las alteraciones germinales que ya hemos comentado en el análisis de tejido, los genes pertenecientes a la hallmark PDAC en los que detectamos **alteraciones somáticas oncogénicas o potencialmente oncogénicas** en más del 50% de las muestras de plasma fueron: *TP 53* (79% de las muestras) y *KRAS* (55%). Como cabía esperar, también encontramos mutaciones

puntuales somáticas con potencial patogénico en el ctDNA de los pacientes en un porcentaje importante en los genes *SMAD4* (7 de 29 pacientes, lo que supone un 24% de muestras) y *CDKN2A* (5 de 29 muestras, un 17%). Otros genes que reunieron nuestros criterios de selección con mutaciones puntuales en al menos cuatro muestras de plasma fueron *BRCA2* (8 de 29, o un 28% de las muestras), *BRCA1* (5/29, un 17%), *MSH2* (5/29, 17%) y *MLH1* (4/29, 14% de los plasmas). Se detectaron mutaciones patogénicas en un 10% de los casos en los genes *MSH6*, *PMS2* y *STK11* (3 muestras de 29) y, en *PALB2* y *TGFR2*, solo hallamos mutaciones en una muestra. En la figura 12 podemos ver estos resultados, con los genes agrupados: en la parte superior los cuatro genes clásicos descritos como con mayor porcentaje de mutaciones en cáncer de páncreas (genes más prevalentes en adenocarcinoma de páncreas), seguidos de los relacionados con deficiencia de recombinación homóloga (HRD), deficiencia del sistema de reparación por apareamiento erróneo (MMRD) y el gen supresor de tumores que codifica para el receptor del factor de crecimiento transformante beta 2 (*TGFRB2*) (194).

Más allá de la descripción de estas alteraciones moleculares detectadas en ctDNA de los pacientes en el momento del diagnóstico, evaluamos si existía un patrón genómico diferencial que condicionara diferencias en la supervivencia. Para ello, comparamos aquellos pacientes con supervivencia o seguimiento mayor de 11 meses frente a los de menor supervivencia, observando en este último grupo mutaciones en genes como *MTOR*, *CDK12* o *EPHA7*, no presentes en los pacientes que vivían más allá de 11 meses. Cuando valoramos las vías génicas en las que están implicadas estos genes mutados exclusivamente en los pacientes de menor supervivencia, encontramos un enriquecimiento en genes de la vía de “regulación negativa de los componentes de organización celular”. En cambio, cuando analizamos los pacientes con supervivencia mayor de 11 meses, detectamos mutaciones sólo presentes en este subgrupo en *MLH3* o en 9 genes *ZNF*, lo que sugiere mejor pronóstico probablemente relacionado con alteraciones en la vía de regulación y reparación del DNA.

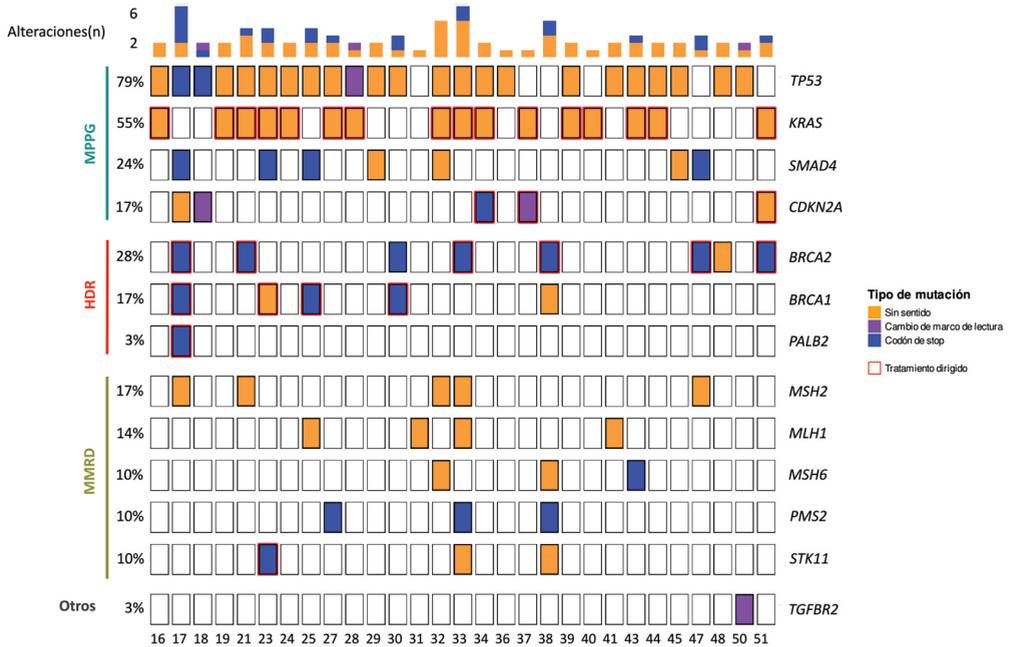


Figura 12. Representación de las SNVs detectadas en las muestras de plasma. Cada columna corresponde a un paciente. A la derecha, los genes en los que se han detectado mutaciones y, a la izquierda, el porcentaje de muestras con mutaciones para ese gen y la vía o subgrupo en el que se podría incluir dicho gen. Los diferentes colores de relleno de los recuadros representan los distintos tipos de mutaciones detectadas: amarillo en mutaciones *missense* o sin sentido, lila para mutaciones *frameshift* o que implican cambio de marco de lectura y azul aquellas que generan un codón de stop. Aquellas mutaciones con tratamiento potencial según OncoKB aparecen resaltadas con el reborde en rojo. El gráfico de barras de la parte superior indica el número de mutaciones puntuales por muestra de plasma.

Además, analizamos si los pacientes con metástasis hepáticas al diagnóstico presentaban algún patrón génico diferencial a aquellos metastásicos en otras localizaciones. Interesantemente, este grupo de pacientes con enfermedad metastásica hepática desde inicio son los únicos en los que detectamos mutaciones en *KRAS* al realizar el WES de ctDNA, no siendo detectables por esta técnica en pacientes sin afectación metastásica hepática. Como se puede ver en la figura 14, existen otros genes que hallamos diferencialmente mutados en casos con metástasis hepáticas al diagnóstico, siendo la vía génica diferencialmente activada en este subgrupo de pacientes la “adaptativa del sistema inmune”.

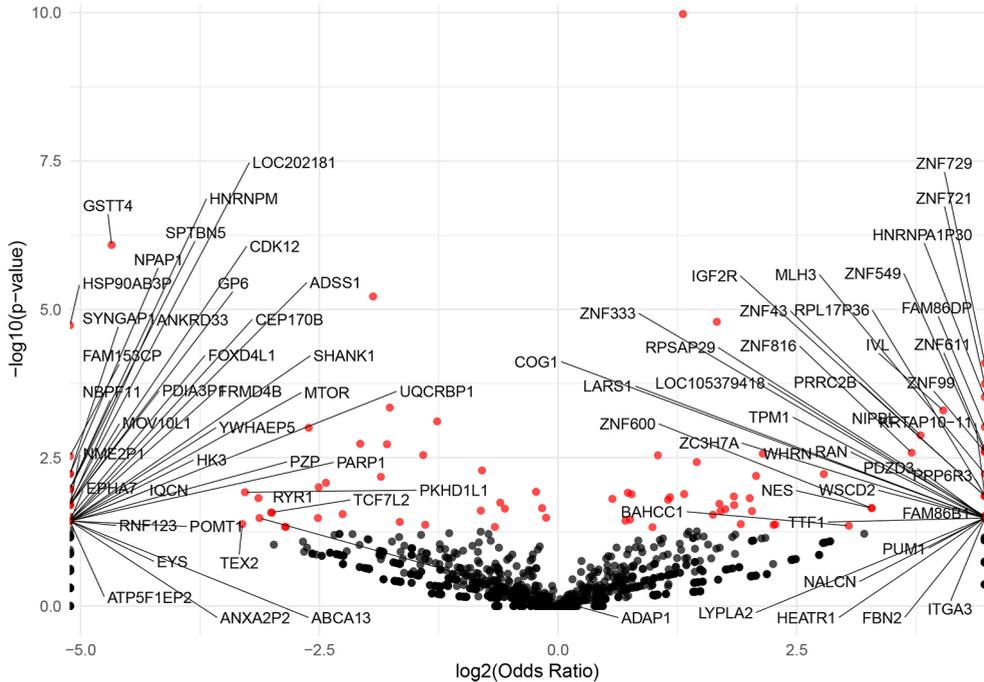


Figura 13. Gráfico volcán representativo de los genes diferencialmente mutados al diagnóstico en pacientes de menor supervivencia. Los genes con diferencias más significativas se localizan hacia los extremos derecho e izquierdo superiores del gráfico.

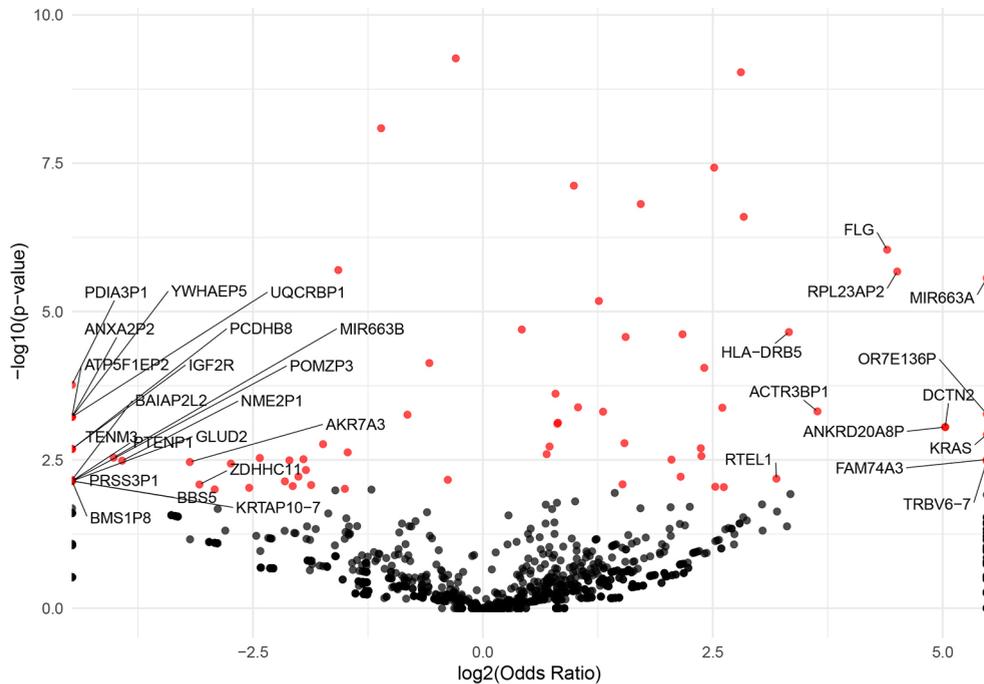


Figura 14. Gráfico volcán representativo de los genes diferencialmente mutados al diagnóstico en pacientes con metástasis hepáticas al diagnóstico.

Al igual que al estudiar las muestras de tejido, con el estudio de WES en ctDNA no sólo pudimos evaluar mutaciones sino también variaciones del número de copias. En 15 de las 29 muestras de plasma detectamos CNVs en alguno de los genes de la hallmark de páncreas, tal y como aparecen representadas en la figura 15. *MSH2* y *TP53* son los genes con mayores CNVs, amplificado en todos los casos el primero y predominantemente deletado *TP53*, lo esperable al tratarse de un gen supresor.

Al realizar el estudio mediante WES de estas muestras plasmáticas, y no sólo analizar los genes pertenecientes a la hallmark de páncreas, encontramos mutaciones anotadas como oncogénicas en otras bases de datos como OncoKb. De este modo, y más allá de la detección de alteraciones patogénicas, identificamos aquellas con potencial terapéutico: mutaciones **“accionables” o “targetables”**. Cabe destacar que en el 93% de los pacientes con plasma analizable (27 de los 29 casos) detectamos, al menos, una variante somática accionable según OncoKb. Entre ellas podríamos destacar que casi un tercio de los pacientes (31%) podrían beneficiarse de los nuevos inhibidores de *KRAS* en investigación. Entre las variantes de este gen, destaca la identificación de la mutación G12D, detectada en el 28% de las muestras de plasma, pero también la variante G12C en un paciente (3%), alteración en la que el desarrollo de inhibidores está en fases más avanzadas de investigación. El listado completo de estas mutaciones detectadas en plasma de nuestros pacientes, con sus detalles y sus respectivos tratamientos dirigidos, se recoge en la tabla 11.

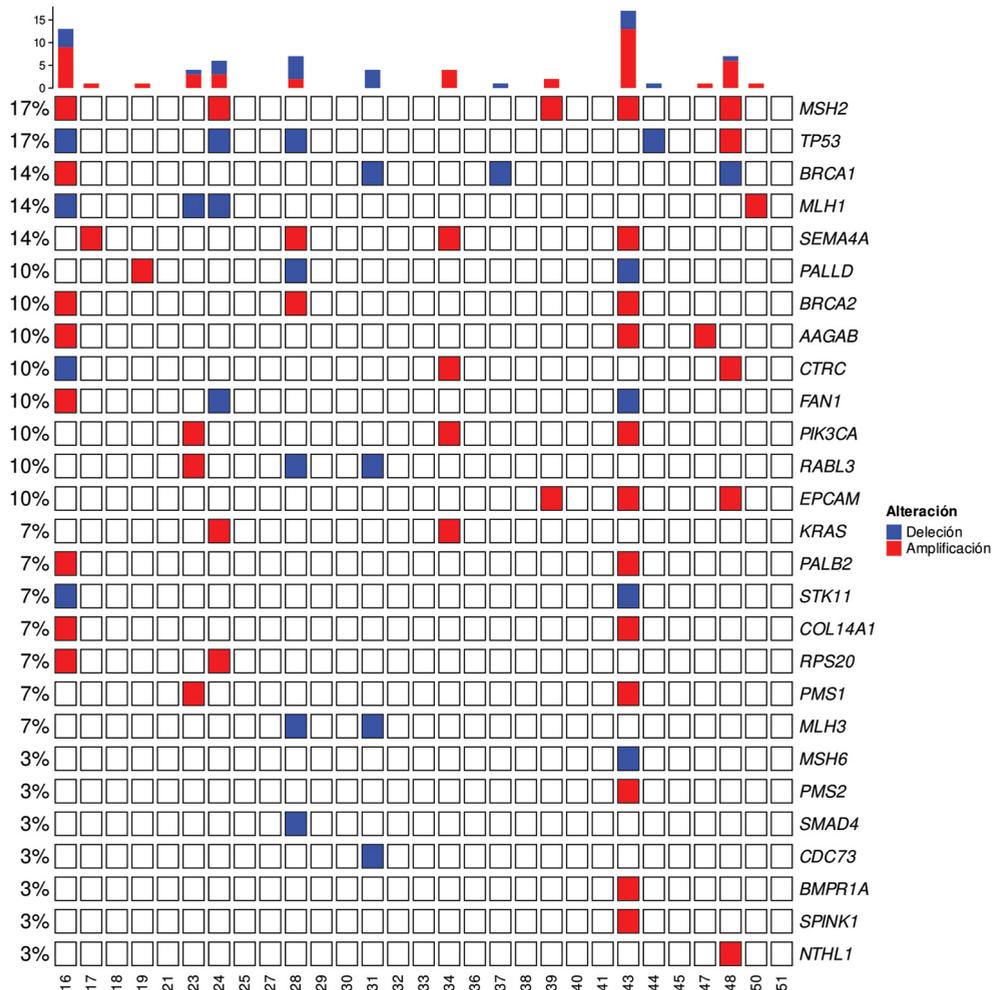


Figura 15. Gráfico que representa las CNV en genes de la hallmark de páncreas detectadas en las muestras de plasma. Cada columna corresponde a la muestra de un paciente. A la derecha se enumeran los genes en los que se han detectado CNVs (deleciones en azul y amplificaciones en rojo). A la izquierda se indica el porcentaje de muestras con mutaciones para ese gen. El gráfico de barras de la parte superior indica el número de alteraciones por muestra, con el mismo código de colores.

En la siguiente página

Tabla 11. Mutaciones potencialmente accionables detectadas en las muestras de plasma.

De izquierda a derecha, en cada columna se describe: el gen o variante del gen en el que encontramos la alteración, si forma parte o no de la hallmark PDAC, si la alteración se ha detectado también en la muestra de parafina del paciente, el número de mutaciones accionables halladas en ese gen, porcentaje de pacientes con la alteración, porcentaje de VAF en el que se detecta, el tipo de mutación y el posible tratamiento indicado para cada mutación por OncoKb.

GEN	GEN EN HPAC	GEN EN FFPE	MUTACIONES ACCIONABLES (n)
<i>KRAS^{G12D}</i>	SÍ	SÍ	8
<i>KRAS^{G12C}</i>	SÍ	NO	1
<i>NF1</i>	NO	SÍ	6
<i>BRCA2</i>	SÍ	SÍ	6
<i>TSC2</i>	NO	NO	5
<i>BRCA1</i>	SÍ	SÍ	4
<i>ARID1A</i>	NO	SÍ	4
<i>ATM</i>	NO	SÍ	3
<i>CDKN2A</i>	SÍ	SÍ	3
<i>PTEN</i>	NO	NO	3
<i>ERBB2</i>	NO	NO	2
<i>RET</i>	NO	NO	2
<i>CHEK2</i>	NO	NO	2
<i>PDGFRA</i>	NO	NO	1
<i>ERCC2</i>	NO	SÍ	1
<i>STK11</i>	SÍ	NO	1
<i>ZRSR2</i>	NO	SÍ	1
<i>CDK12</i>	NO	NO	1
<i>NRAS</i>	NO	NO	1
<i>FANCL</i>	NO	SÍ	1
<i>BARD1</i>	NO	NO	1
<i>RAD51D</i>	NO	NO	1
<i>FGFR1</i>	NO	NO	1
<i>ALK</i>	NO	NO	1
<i>PALB2</i>	SÍ	NO	1

% DE PAC.	% DE PAC.	CONSECUENCIA
28%	38%	missense_variant
3%	4%	missense_variant
21%	1.8%	stop_gained
21%	1.7%	stop_gained
17%	0.5%	missense_variant,stop_gained
14%	0.8%	stop_gained,missense_variant
14%	4.7%	frameshift_variant,stop_gained
10%	1.6%	stop_gained
10%	5.6%	stop_gained,missense_variant
10%	1.1%	missense_variant
7%	0.8%	missense_variant
7%	0.9%	missense_variant
7%	1.9%	splice_donor_variant
3%	0.8%	missense_variant
3%	0.7%	splice_donor_variant
3%	0.5%	stop_gained
3%	1.6%	stop_gained
3%	0.7%	splice_donor_variant
3%	1.0%	missense_variant
3%	1.4%	splice_donor_variant
3%	1.0%	splice_acceptor_variant
3%	0.4%	stop_gained
3%	0.8%	missense_variant
3%	0.9%	missense_variant
3%	0.6%	stop_gained

2.2. Evaluación de la concordancia molecular entre tejido y plasma y de la utilidad del estudio de ctDNA como método de caracterización de la heterogeneidad intratumoral.

Como ya se ha comentado en el primer objetivo, en 10 de los 37 pacientes fue posible la secuenciación óptima y conocer las alteraciones somáticas del tejido parafinado. De estos 10 pacientes, en 2 de ellos no disponíamos de plasma analizable al diagnóstico, por lo que finalmente en 8 pacientes se pudieron comparar los resultados de la secuenciación del exoma de forma pareada tejido-ctDNA.

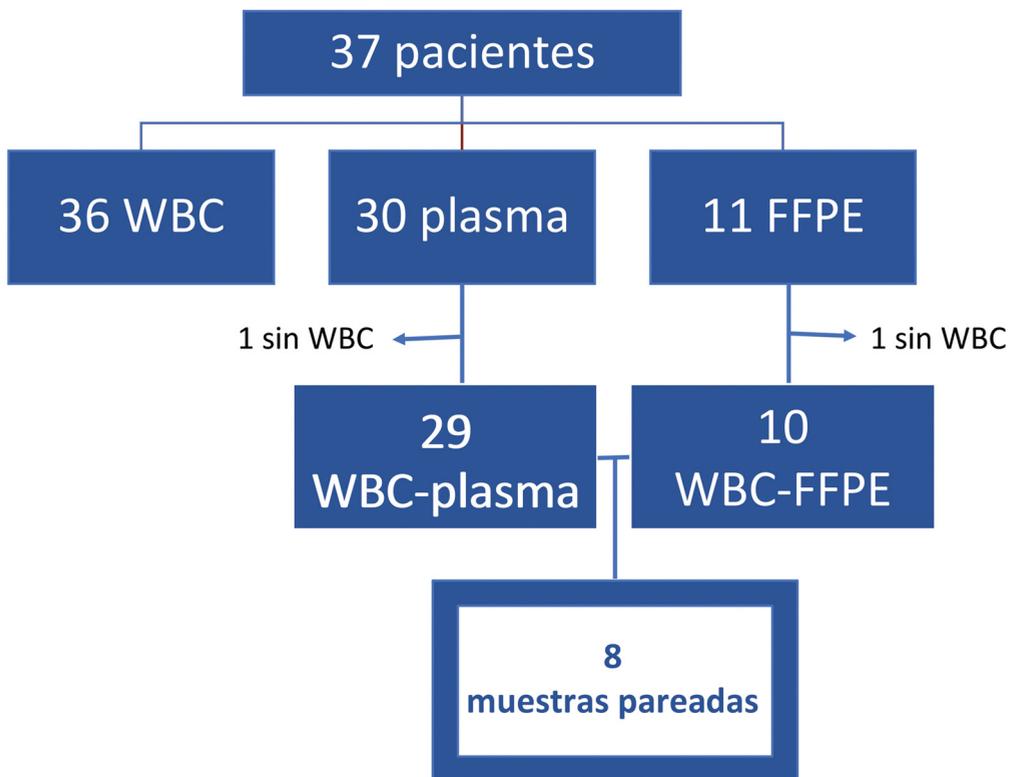


Figura 16. Diagrama de flujo representativo de las muestras disponibles de los pacientes de la cohorte de descubrimiento para el estudio óptimo mediante WES. WBC: White blood cells (células mononucleadas de sangre periférica). FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded tissue (muestras de tejido parafinado)

De manera esperable con todo lo comentado anteriormente, los genes con mayor porcentaje de mutaciones detectadas en estos ocho casos pareados fueron *KRAS* y *TP53*, mutados en siete de los ocho pacientes (88%), seguidos de *CDKN2A* (3 de 8 casos, un 38%), *SMAD4* y *MSH2* (en ambos genes 2 pacientes de los 8, un 25%). En el caso de *KRAS*, estas mutaciones se detectaron tanto en tejido como en ctDNA en cinco de esos siete pacientes y en dos de ellos sólo las encontramos en la muestra de parafina (concordancia de 75%). Las mutaciones en *TP53* fueron coincidentes en un 62.5 % de los casos (en cuatro de siete presentes tanto en plasma como en tejido y un caso sin mutaciones), detectándose sólo en plasma en los otros tres casos. También encontramos mutaciones en *CDKN2A* tanto en plasma como en tejido en dos de los tres pacientes, identificando la tercera mutación en este gen exclusivamente en plasma (concordancia de 87.5 %). En el resto de genes mutados, estas alteraciones las hallamos únicamente en ctDNA (*SMAD4*, *MSH2*, *BRCA2*, *MSH6* y *TGFBR2*) o en las muestras de tejido (*BRCA1*, *MLH3* y *PALLD*), como se representa en la figura 17.

Teniendo en cuenta todas las mutaciones somáticas puntuales de muestras de tejido y plasma en el mismo momento de recolección (al diagnóstico, antes de iniciar tratamiento) de estos 8 casos, realizamos una comparación intrapaciente de éstas. Con ello, observamos una mediana de concordancia entre las mutaciones somáticas detectadas en plasma frente a muestras de tejido de nuestra selección de genes del 20%, representada en la figura 18.

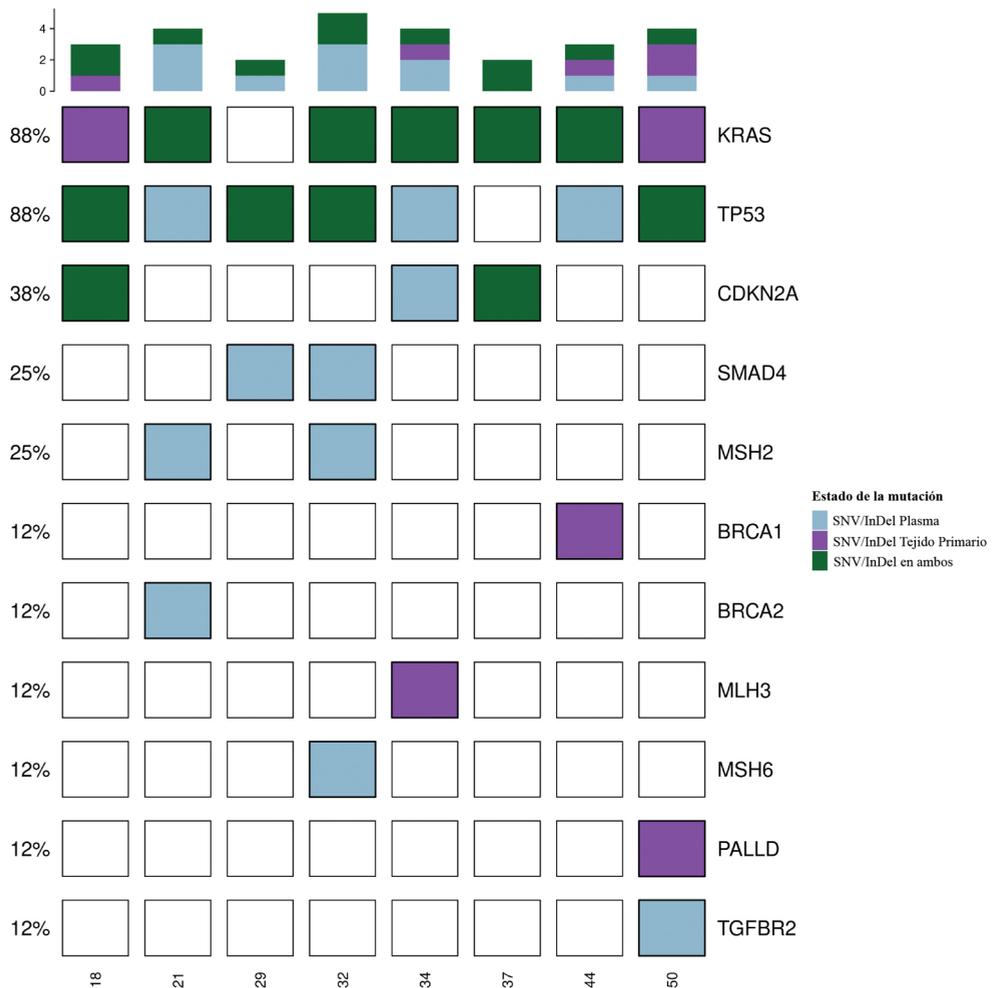


Figura 17. Panorama mutacional de las alteraciones detectadas en las muestras pareadas.

Comparativa de las mutaciones oncogénicas de muestras basales de plasma y tejido de los ocho pacientes con adenocarcinoma de páncreas en las que disponíamos muestras pareadas, representando a cada paciente en una columna. Cada recuadro representa un gen en un determinado paciente, coloreado en caso de haber encontrado alguna mutación oncogénica: azul en caso de que la mutación se detecte en el plasma, lila si se detecta en tumor primario y verde si se detecta en plasma y tumor. En el eje de ordenadas se indica el porcentaje de pacientes en los que se han detectado mutaciones en cada gen en cualquiera de las muestras.

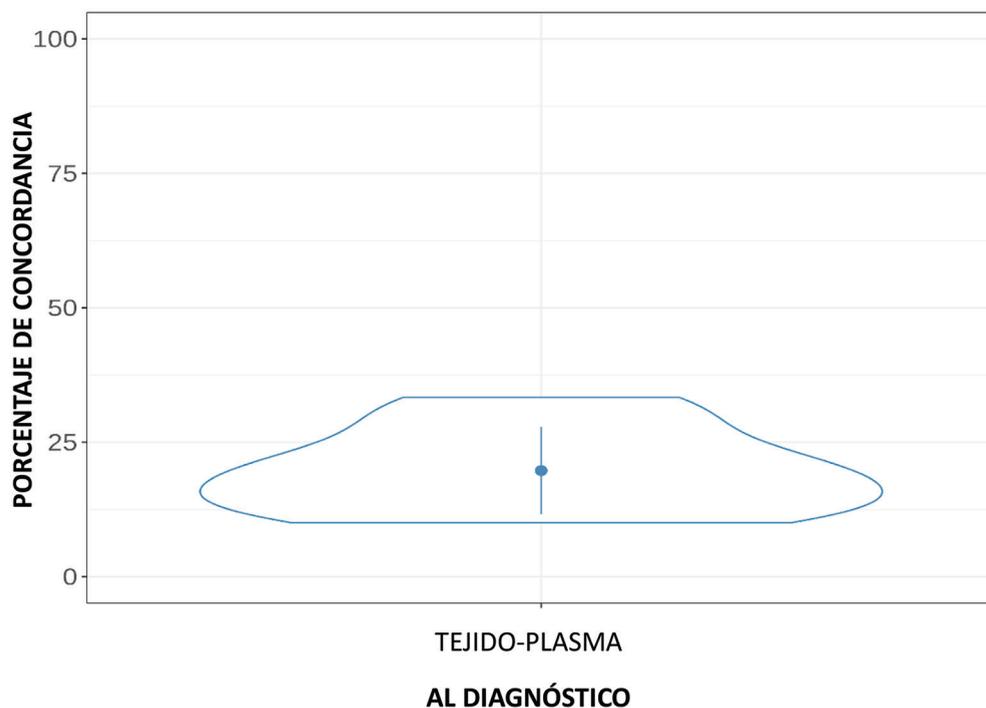


Figura 18. Concordancia de mutaciones de muestras pareadas de tejido y plasma. Porcentaje de concordancia de las SNV basales del tumor primario y del plasma entre el número de pacientes. La concordancia mediana de la cohorte se muestra con un punto (20%).

Discusión del objetivo 2

Mediante la realización de WES en muestras de plasma fuimos capaces de describir el panorama mutacional de una cohorte de pacientes con adenocarcinoma de páncreas estadio IV antes de iniciar tratamiento. A grandes rasgos, los genes en los que detectamos alteraciones en el plasma se aproximan a los descritos hasta el momento en la bibliografía y en los diferentes artículos de secuenciación en cáncer de páncreas (38,39,43–45). Este hecho nos hace pensar que el estudio de mutaciones en muestras de plasma de pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado, podría resultarnos de gran utilidad si, a través de él, pudiéramos detectar alteraciones con potencial terapéutico.

Si nos fijamos en las mutaciones detectadas en plasma en nuestra cohorte, probablemente lo que más llame la atención sea el porcentaje relativamente bajo de mutaciones que encontramos en *KRAS*. Sabemos que en torno al 90% de los tumores pancreáticos tipo adenocarcinoma presentan mutaciones en este gen, por lo que quizá la detección en un 55% de las muestras plasmáticas podría parecernos pobre. Este número de mutaciones halladas en *KRAS* “menor al esperado” podría deberse a diversas circunstancias. Lo primero que deberíamos tener en consideración es si las muestras presentaban las condiciones necesarias para poder realizar este análisis, hecho que se tuvo en cuenta al establecer los criterios de calidad mínimos que debían tener éstas, tal y como se describe en el apartado de material y métodos. Otra posibilidad que podría justificar esta cifra sería una sensibilidad de la técnica insuficiente. Como desarrollaremos en el apartado siguiente, además de WES, en estas muestras también analizamos las mutaciones de *KRAS* mediante ddPCR, técnica a priori de mayor sensibilidad. Aunque el porcentaje de muestras en los que detectamos mutaciones en *KRAS* fue superior con ddPCR (76%), la concordancia entre ambas técnicas fue del 83%. Es importante tener en cuenta que toda técnica puede tener sus falsos negativos y que los niveles de ctDNA, pese a que son pacientes con tumores avanzados, pueden ser muy bajos en casos con menor carga de enfermedad metastásica, cuando las metástasis son de determinadas localizaciones como el peritoneo o en tumores denominados “no secretores” (195).

Pese a que por la complejidad del análisis e interpretación de los datos centramos la representación de los resultados en los genes incluidos en la hallmark PDAC, al realizar el estudio mediante WES, además de estas alteraciones, encontramos mutaciones en otros genes anotadas como oncogénicas en otras bases de datos. La identificación de estas mutaciones no incluidas en la hallmark, podría proporcionar información valiosa sobre otras vías de señalización alteradas en este tipo de tumoral, mejorar el conocimiento y clasificación de los pacientes, y el descubrimiento de nuevas alternativas de terapia dirigida. De este modo, si ampliamos el espectro de genes estudiados, en todos los pacientes de nuestra cohorte detectamos, al menos,

una variante somática patogénica. Estas alteraciones, incluso aunque no sean accionables, podrían resultarnos de utilidad a la hora de mejorar el conocimiento de la enfermedad y servirnos, por ejemplo, para monitorizar el ctDNA durante la evolución del paciente u ofrecernos información pronóstica.

De este modo, a pesar de que los resultados estén limitados por el número de casos, en nuestro grupo de 29 pacientes pudimos distinguir una serie de genes que se detectaban en ctDNA de forma exclusiva en plasma de pacientes con supervivencia menor de 11 meses, mediana de supervivencia aproximada de los ensayos de primera línea de pacientes avanzados con triplete de quimioterapia (28,30). Al evaluar a qué vías génicas pertenecen estos genes que están exclusivamente mutados en pacientes de peor supervivencia, encontramos un aumento de mutaciones en genes de la vía de regulación negativa de los componentes de organización celular. Las alteraciones en estos genes, encargados de la movilidad celular, proporcionarían a las células tumorales mayor capacidad de invasión, diseminación y metastatización, lo que probablemente condicione este peor pronóstico. Aquellos pacientes con mejor pronóstico, por el contrario, presentaban mutaciones en genes relacionados con la vía de regulación y reparación del ADN, que probablemente impliquen mayor supervivencia por sí mismos o por condicionar mejores respuestas a tratamiento. También fuimos capaces de distinguir un patrón de mutaciones diferencial entre aquellos pacientes con metástasis hepáticas al diagnóstico, localización metastática de peor pronóstico conocido frente a otras localizaciones (28,29,196,197). Aunque entre estos genes destaca *KRAS*, ya descrito como asociado a la presencia de metástasis hepáticas en otros trabajos (198,199), encontramos otros genes diferencialmente mutados en este grupo de pacientes, con un enriquecimiento de mutaciones en los genes de la vía adaptativa del sistema inmune. Además de la limitación del número de pacientes, en esta observación también tendríamos que considerar el factor de la diferente capacidad de liberación de ADN tumoral al plasma según la localización metastática y la carga tumoral (195).

En cuanto a la detección de alteraciones en plasma con potencial terapéutico, el porcentaje de casos en los que detectamos mediante WES alteraciones accionables según OncoKB en ctDNA podemos considerarlo alto: 93% (27 de 29 pacientes). A destacar que, si sólo consideramos el análisis de los 30 genes de la hallmark PDAC, el número de pacientes en los que detectamos este tipo de alteraciones subsidiarias de tratamiento dirigido se reduciría a 21 casos, un 72% de los pacientes. Si nos fijamos en el número de genes y mutaciones en los que encontramos alteraciones, detectamos 33 mutaciones accionables en 6 de los genes de la hallmark PDAC, mientras que, ampliando el estudio con WES fuimos capaces de identificar 70 mutaciones en 24 genes distintos que potencialmente podrían responder a un tratamiento dirigido según OncoKb.

Por otro lado, mediante el estudio de WES del ctDNA detectamos mutaciones oncogénicas y con potencial terapéutico según OncoKb en genes como *NF1*, *TSC2*, *CHECK2*, *PTEN* o *CDK12*, que no sólo no están descritos en la hallmark PDAC, sino que además no los hallamos mutados en las muestras de tejido tumoral. De un modo opuesto, también encontramos mutaciones accionables de forma exclusiva en tejido y no en plasma en un 10% de los casos, en genes como *MTOR*, *EZH2* y *SF3B1*. En total, en las muestras de tejido detectamos 9 mutaciones accionables en 7 genes, mientras que en ctDNA identificamos 14, distribuidas en 8 genes. Si consideramos sólo aquellos pacientes en los que disponíamos muestras pareadas, igualmente el número de mutaciones accionables detectadas en plasma fue igualmente superior frente al tejido (11 frente a 9). Todo ello nos sugiere una doble ventaja del estudio molecular en plasma basal frente al tejido a la hora de ofrecer alternativas terapéuticas: por una parte, supondría un método más accesible y menos invasivo que las biopsias tisulares clásicas (en ocasiones lesiones ni siquiera biopsiables) y, por otra, capaces de capturar un mayor espectro de alteraciones accionables, probablemente por su capacidad de detectar la heterogeneidad tumoral.

En relación con las similitudes y disparidades de los análisis de tejido y plasma no sólo considerando las mutaciones accionables sino todas las patogénicas, hicimos una comparación de los resultados del estudio de WES en los ocho pacientes en los que disponíamos de estos dos tipos de muestra. Globalmente, la concordancia tejido-plasma en este subgrupo fue del 20%. En algunos casos, el análisis de tejido tumoral mostró un conjunto de mutaciones que no detectamos en el plasma, probablemente por la capacidad heterogénea de los clones formadores de tumor a la hora de liberar ctDNA. Sin embargo, también observamos el evento opuesto, identificando algunas mutaciones puntuales exclusivamente en el plasma y no en tejido. Específicamente, 47.7% de todas las mutaciones oncogénicas fueron eventos exclusivos del plasma. Este fenómeno con alta probabilidad se deba a la heterogeneidad intratumoral y la evolución clonal del tumor en su diseminación incluso sin estar sometido a la presión de tratamiento, ya que en una muestra de parafina sólo se analiza un área muy escasa y limitada de la enfermedad.

3. Valoración de la utilidad clínica de la detección y monitorización en plasma mediante ddPCR de mutaciones de *KRAS* como biomarcador en pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado (objetivo 3).

En esta cohorte de 37 pacientes con cáncer de páncreas metastásico, además de realizar WES, analizamos mediante ddPCR las mutaciones de *KRAS* G12/G13 en las muestras de plasma al diagnóstico y en las subsiguientes valoraciones de respuesta al tratamiento.

De los 29 pacientes en los que fue posible realizar WES, detectamos mutaciones en el gen *KRAS* en la muestra de plasma basal mediante este método en 17 de ellos. Si analizamos estas mismas muestras mediante ddPCR, en 22 casos encontramos mutaciones de *KRAS*. En 4 de los 5 pacientes discordantes (detectada la mutación por ddPCR, pero no en el estudio de WES), la VAF detectada mediante ddPCR fue ≤ 1 (0.45, 0.6, 0.6 y 1). En el quinto caso que no detectamos mutaciones en

KRAS al hacer el análisis con WES, la VAF obtenida por ddPCR fue 2.4. En ninguna muestra plasmática hallamos mutaciones en este gen en el análisis de WES que no se hubieran detectado con ddPCR. Todo ello supone una concordancia entre estos dos métodos del 83% (24 de los 29 pacientes).

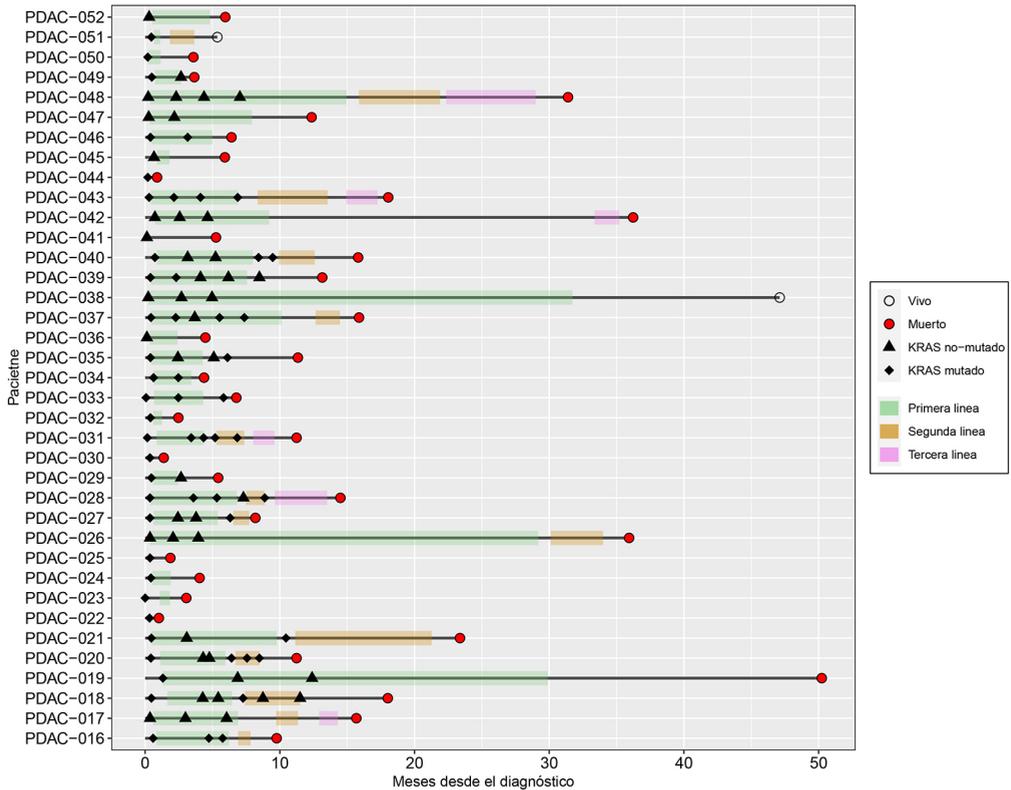


Figura 19. Gráfico tipo “swimmer plot” representativo de la evolución en el tiempo de los pacientes de la cohorte de descubrimiento y el estatus de la mutación de *KRAS* analizado por ddPCR durante la evolución. Cada línea representa a cada uno de los pacientes del eje de ordenadas y, en el eje de abscisas, se indica el tiempo en días desde el diagnóstico en el que se realiza cada determinación o suceden los eventos. Con un rombo azul se señalan las determinaciones en las que no se detecta la mutación de *KRAS* por ddPCR y con un triángulo las muestras con mutaciones de *KRAS* al analizarlas por esta misma técnica. Los puntos rojos marcan el momento en el que se produce el fallecimiento del paciente. Los puntos blancos representan los pacientes vivos en el último seguimiento del centro (una paciente continúa viva y otro paciente fue pérdida de seguimiento).

De los 29 pacientes en los que fue posible realizar WES, detectamos mutaciones en el gen *KRAS* en la muestra de plasma basal mediante este método en 17 de ellos. Si analizamos estas mismas muestras mediante ddPCR, en 22 casos encontramos mutaciones de *KRAS*. En 4 de los 5 pacientes discordantes (detectada la mutación por ddPCR, pero no en el estudio de WES), la VAF detectada mediante ddPCR fue ≤ 1 (0.45, 0.6, 0.6 y 1). En el quinto caso que no detectamos mutaciones en *KRAS* al hacer el análisis con WES, la VAF obtenida por ddPCR fue 2.4. En ninguna muestra plasmática hallamos mutaciones en este gen en el análisis de WES que no se hubieran detectado con ddPCR. Todo ello supone una concordancia entre estos dos métodos del 83% (24 de los 29 pacientes).

En estos 37 pacientes, en los que estudiamos las muestras de plasma mediante WES y también determinamos las mutaciones de *KRAS* por ddPCR (cohorte de descubrimiento), evaluamos si la detección de mutaciones en este gen con esta segunda técnica implicaba peor pronóstico. Para ello, comparamos la supervivencia libre de progresión a la primera línea (SLP) y la supervivencia global (SG) entre los pacientes en los que detectábamos mutaciones de *KRAS* (positivos por ddPCR) y aquellos en los que no se detectaba (negativos). Realizamos esta comparativa tanto en las muestras basales de todos estos 37 pacientes (antes de iniciar tratamiento), como en las que extrajimos en el momento de la primera valoración de respuesta (post-tratamiento) en aquellos en los que disponíamos de ella (24 pacientes). En la determinación inicial, en 27 de los 37 pacientes detectamos la mutación de *KRAS* y en el caso de la primera valoración de respuesta, 8 de los 24 casos mantenían detectable *KRAS* (tabla 12).

Al comparar la evolución entre los pacientes positivos y negativos, encontramos diferencias estadísticamente significativas en SLP entre ambos subgrupos, con una peor SLP de los positivos frente a los negativos, tanto si eran positivos en la momento inicial como en la primera valoración de respuesta (HR=2.315, CI 95%= 1.027-5.217, $p = 0.038$ y HR =2.838, CI 95%= 1.104-7.296, $p = 0.024$ respectivamente, figura 20

A y B). En cuanto a la supervivencia global (SG), fue peor en los que detectamos las mutaciones de *KRAS* en la primera valoración de respuesta (HR= 2.923, CI 95%= 1.119-7.636, p = 0.022), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en SG entre positivos y negativos en las muestras basales (p= 0.074).

Para comprobar estos resultados y ampliar el número de pacientes para realizar otros posibles estudios, analizamos de la misma forma las mutaciones de *KRAS* por ddPCR en la segunda cohorte de 43 pacientes con adenocarcinoma de páncreas avanzado (cohorte de validación). Estos casos fueron reclutados a continuación de la cohorte anterior, bajo los mismos requisitos para su inclusión y manejados por los mismos profesionales con tratamientos y criterios clínicos análogos. En la tabla 12 se recogen los estados de la mutación de *KRAS* basal y en la primera evaluación de respuesta.

<i>KRAS</i> status	Cohorte de descubrimiento (n=37)		Cohorte de validación (n=43)	
	Basal (n=37)	1ª evaluación (n= 24)	Basal (n=43)	1ª evaluación (n= 25)
Detectable (positivo)	27	8	33	10
No detectable (negativo)	10	16	10	15

Tabla 12. Estado de la mutación de *KRAS* en muestras de plasma antes de iniciar tratamiento (basal) y en el momento de primera valoración de respuesta (1ª evaluación) en la cohorte de descubrimiento y de validación.

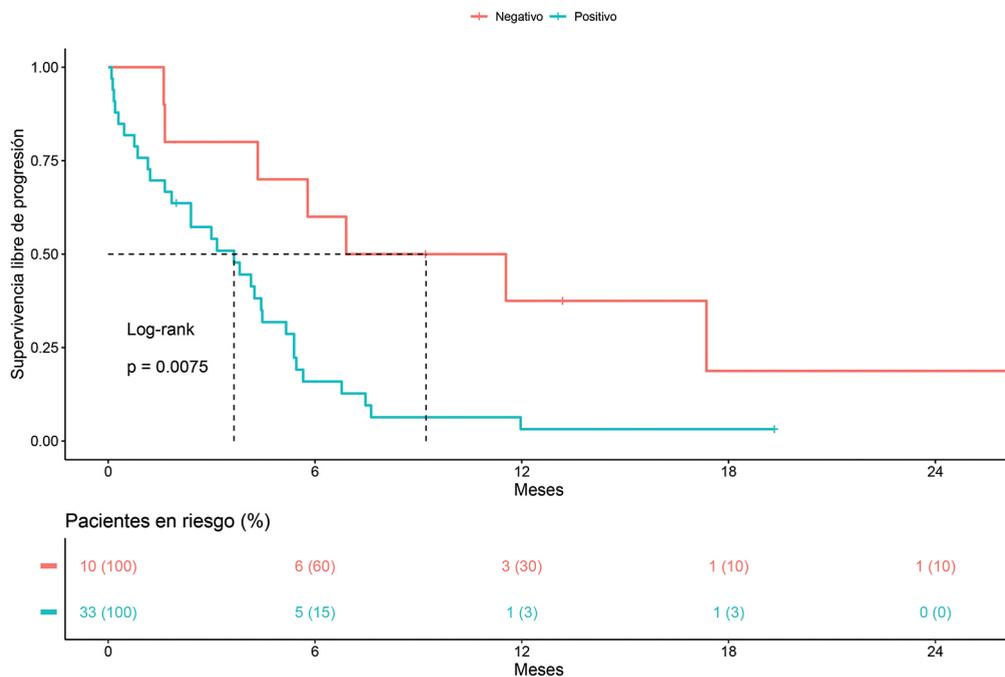
Figura 20. Representación de la SLP de pacientes con mutación detectable de *KRAS* por ddPCR (positivos) frente a los que no se detecta (negativos) en la cohorte de descubrimiento. Curva de Kaplan-Meier según el estatus de mutación de *KRAS* en el momento basal (A) y en el momento de la primera valoración de respuesta a tratamiento (B)

Al igual que en la cohorte inicial de descubrimiento, en los pacientes en los que detectamos por ddPCR la mutación de *KRAS*, tanto en las muestras pre-tratamiento o basales como post-tratamiento (primera evaluación de respuesta), tuvieron una SLP menor, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (HR = 3.022, CI 95% = 1.299 - 7.030, $p= 0.0075$ en las muestras basales y HR = 3.430, CI 95% = 1.365 - 8.619, $p= 0.007$ en la primera evaluación de respuesta, Figura 21 A y B). En este grupo, la SG fue menor en los pacientes *KRAS* positivos antes de iniciar tratamiento frente a los negativos (HR = 3.759, CI 95% = 1.307 - 10.81, $p = 0.009$, figura 21 C), pero no en el momento de la primera valoración de respuesta ($p = 0.084$, Figura 21 D).

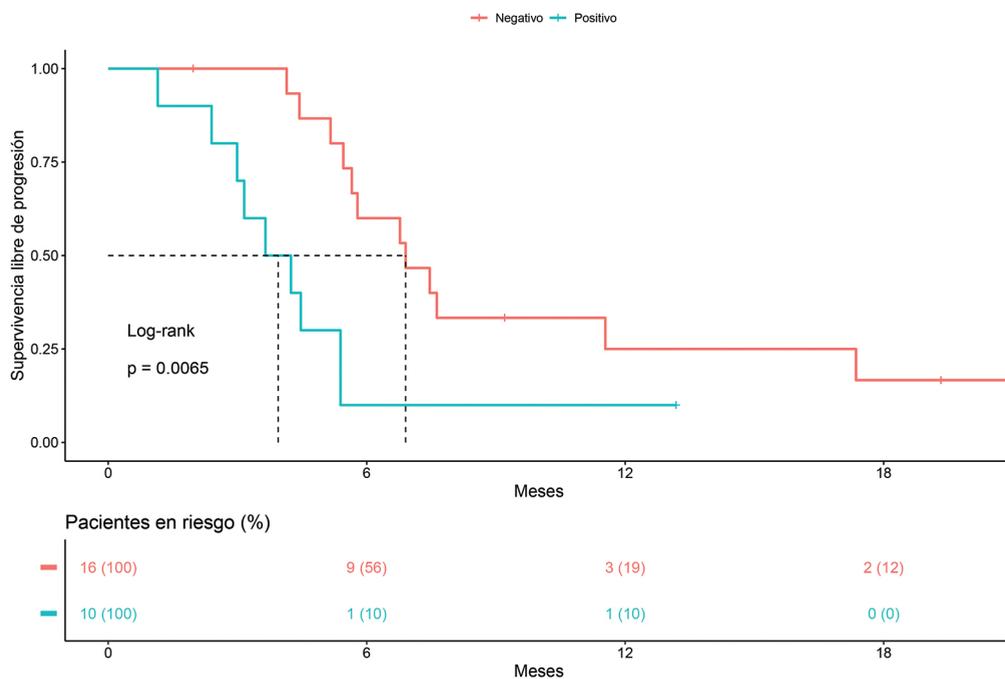
Adicionalmente, intentamos evaluar el valor pronóstico que podrían tener los cambios de situación en la detección de *KRAS* por ddPCR con el tratamiento de primera línea. Es decir, si aquellos pacientes en los que habíamos detectado la mutación de *KRAS* en el momento inicial y la siguiente determinación tras iniciar tratamiento era negativa, tenían distinto pronóstico que aquellos en los que continuábamos detectando *KRAS* tras el inicio de tratamiento. Para ello, dado el número reducido de pacientes de los que dispondríamos en cada subgrupo, realizamos en análisis teniendo en cuenta los pacientes de las dos cohortes en su conjunto ($n=80$).

Figura 21. Representación de la SLP y SG de pacientes con mutación detectable de *KRAS* por ddPCR (positivos) frente a los que no se detecta (negativos) en la cohorte de validación. Curvas de Kaplan-Meier de SLP según el estatus de mutación de *KRAS* en el momento basal (A) y en el momento de la primera valoración de respuesta a tratamiento (B) en la cohorte de validación. Curvas Kaplan-Meier de SG según status de *KRAS* en la muestra basal (C) y en la primera valoración de respuesta (D)

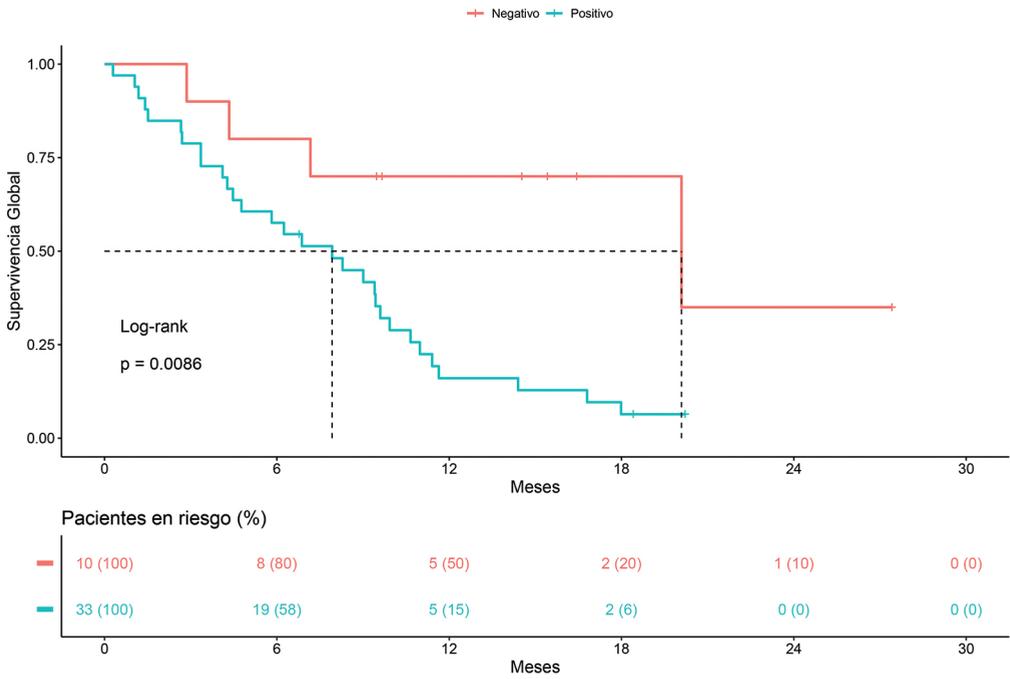
A Pre-tratamiento



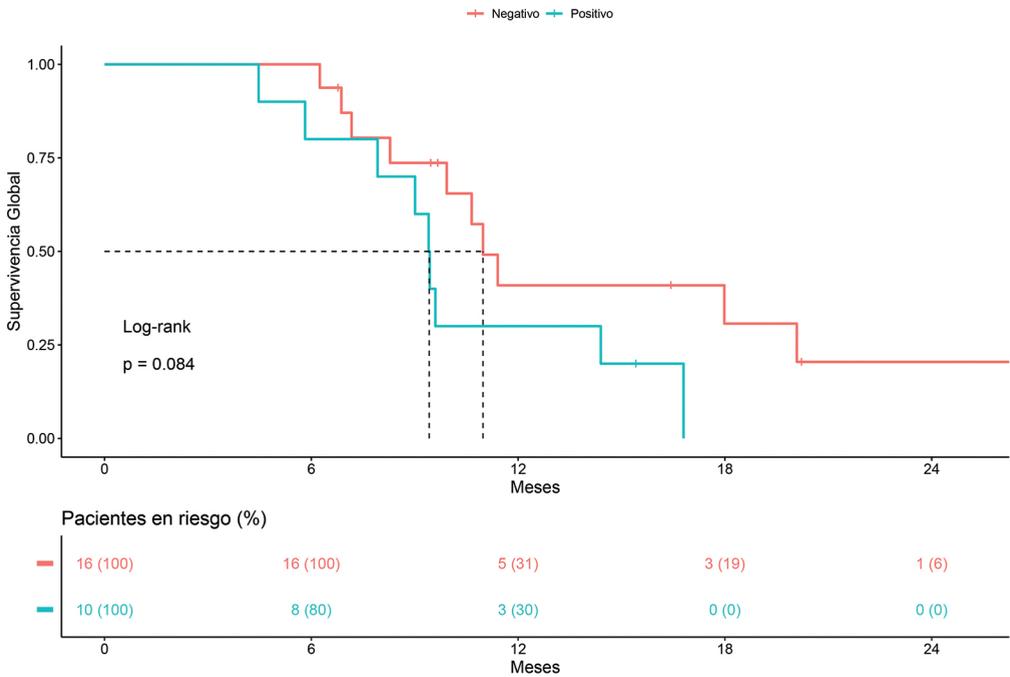
B Post-tratamiento



C Pre-tratamiento



D Post-tratamiento



Pese a no hallar diferencias en SG ($p = 0.093$), tras hacer comparación múltiple, objetivamos que los pacientes que mantenían la positividad de *KRAS* en el momento de primera evaluación de respuesta tenían peor SLP que los que se mantenían negativos ($p = 0.003$). Del mismo modo, aquellos pacientes que seguían siendo positivos en la primera evaluación de respuesta tenían peor SLP que los que pasaban de positivos a negativos ($p = 0.003$) (Figura 22).

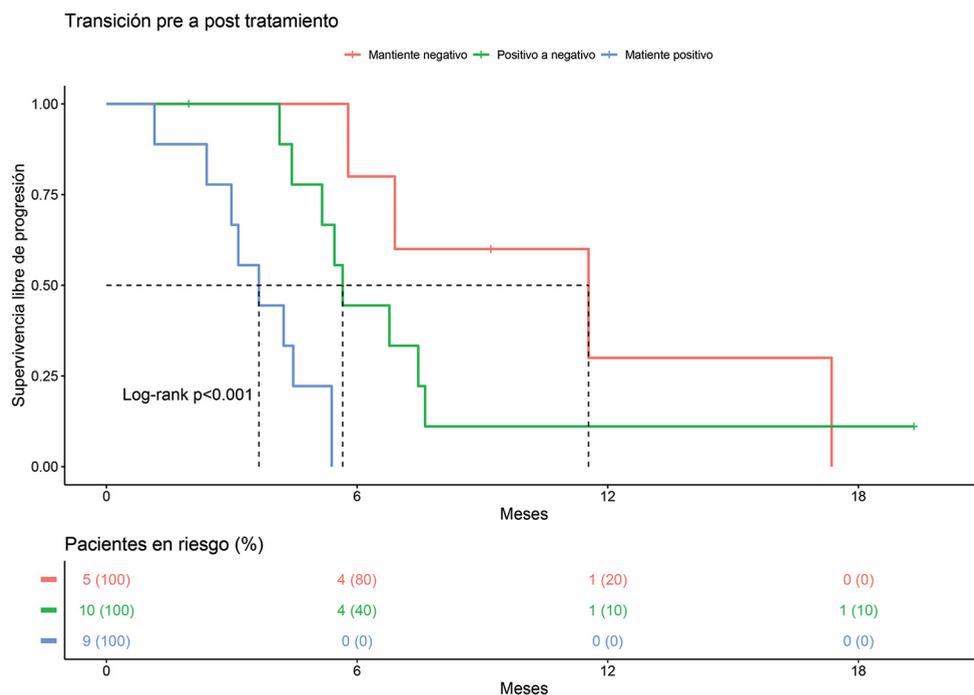


Figura 22. Análisis de Kaplan-Meier de todos los pacientes según la evolución del status de KRAS durante tratamiento de primera línea. En rojo se representa la curva de SLP de los pacientes con detección indetectable de KRAS tanto en el momento inicial como en la primera evaluación de respuesta (persistentemente negativos), en verde aquellos que detectamos KRAS en las muestras basales pero no en la primera valoración de respuesta (convertidos a negativos) y en rojo aquellos en los que se detecta KRAS en ambas muestras (persistentemente positivos).

Teniendo en cuenta que la ddPCR no sólo nos proporciona información de positividad o negatividad, sino que nos ofrece el resultado del valor numérico de la fracción alélica mutada (VAF) detectada en los casos positivos, intentamos evaluar si existía un punto de corte de reducción de VAF que nos permitiera distinguir el

pronóstico de los pacientes. Al analizar el curso de los 37 pacientes de la cohorte inicial o de descubrimiento en términos de SLP, estimamos que una reducción de, al menos, el 84.75% del valor de la VAF de *KRAS* entre la determinación inicial y la primera muestra tras inicio de tratamiento suponía diferencias en SLP ($p = 0.006$, figura 23). Este mismo punto de corte se mantenía como el diferenciador pronóstico en cuanto a SLP en la cohorte de validación (HR = 5.942, CI 95% = 1.801 - 19.61, $p = 0.001$, Figura 24), por lo que concluimos que se trataba del punto de corte óptimo.

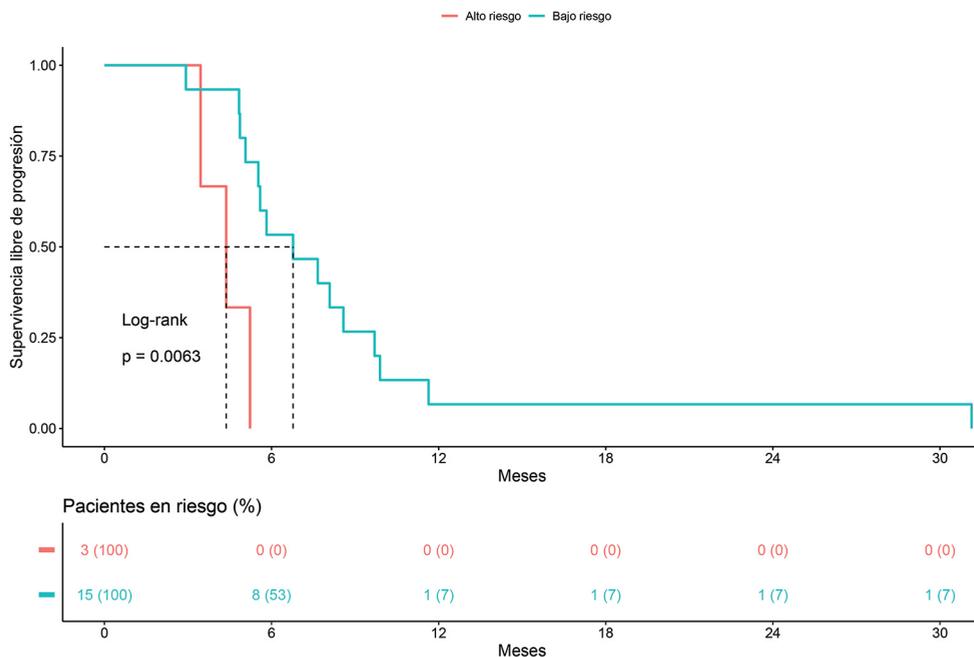


Figura 23. Curva Kaplan-Meier de SLP de los pacientes de “alto riesgo” (con reducción de VAF $\leq 84.74\%$) frente a “bajo riesgo (reducción $> 84.75\%$) en la cohorte de descubrimiento.

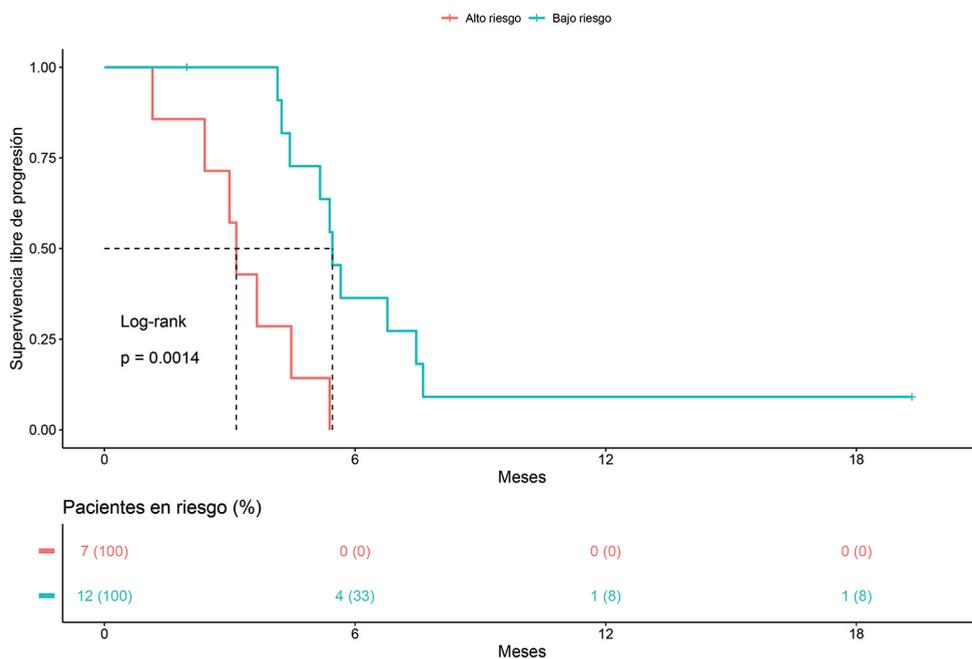


Figura 24. Curva Kaplan-Meier de SLP de los pacientes de “alto riesgo” (reducción de VAF $\leq 84.74\%$) frente a los de “bajo riesgo” (reducción $> 84.75\%$) en la cohorte de validación.

Para evaluar la posible asociación o dependencia de otras variables que sabemos pueden ser relevantes para el pronóstico en la práctica clínica, introdujimos este biomarcador en una regresión de Cox multivariable y seleccionamos el mejor modelo de acuerdo con el criterio de información de Akaike (AIC). El AIC más bajo (59,77) se logró en un modelo que incluía el estado ECOG y nuestro biomarcador, que fue el único que permaneció significativo en el análisis multivariante (HR = 6.71, IC 95% = 1.77 – 25.38, p = 0.005, Tabla 13).

		Univariante		Multivariante	
		HR (CI 95%)	p-valor	HR (CI 95%)	p-valor
Edad	< 65 años	-	-	-	-
	≥65 años	0.63 (0.23-1.79)	0.390	-	-
ECOG performance status	0	-	-	-	-
	1	1.94 (0.24-15.51)	0.532	1.48 (0.18-12.53)	0.718
	≥2	12.93 (0.99-169.09)	0.051	9.31 (0.60-143.64)	0.110
Metástasis hepáticas	No	-	-	-	-
	Sí	1.01 (0.27-3.69)	0.994	-	-
Reducción VAF	≥84.75%	-	-	-	-
	< 84.74%	7.12 (1.97-25.77)	0.003	6.71 (1.77-25.38)	0.005
CA 19.9 basal*	> 27 U/mL	-	-	-	-
	≤ 27 U/mL	3.37 (0.68-16.83)	0.139	-	-

Tabla 13. Regresión de COX univariante y multivariante en la cohorte de validación. * 27 U/mL es la cifra de límite superior de la normalidad para el marcador CA 19.9 en nuestro laboratorio.

Discusión del objetivo 3

La accesibilidad de las muestras de sangre posiciona al ctDNA como un potencial biomarcador idóneo para poder utilizarlo en la práctica clínica. Además, la escasa invasividad necesaria para su extracción, nos permite repetir las determinaciones a lo largo del curso de la enfermedad de forma poco cruenta. El alto porcentaje de tumores pancreáticos que presenta mutaciones en *KRAS* lo convierte en un gen candidato destacado para desempeñar esta función en un tumor en el que, como

hemos comentado, en muchas ocasiones resulta dificultoso obtener tejido tumoral apto para secuenciación.

Mientras en algunas series la detección de estas mutaciones ha demostrado impacto en supervivencia global (116,117,120,200) en nuestros pacientes resultó pronóstico en términos de supervivencia libre de progresión, tanto al diagnóstico como en la primera valoración de respuesta, pero no claramente diferenciador en el caso de supervivencia global. Una posible explicación a este hecho podría ser el tamaño reducido de nuestra muestra, siendo todavía menor el número de pacientes en los que disponíamos de ctDNA en el momento de la valoración de respuesta.

Si atendemos a la dinámica de la VAF de *KRAS* durante la evolución de la enfermedad y el tratamiento de primera línea, también fuimos capaces de diferenciar el pronóstico de los pacientes en los que seguíamos detectando mutaciones en este gen en el momento de la primera valoración de respuesta frente a aquellos en los que esta mutación se hacía indetectable o lo era desde el principio. Una novedad de este trabajo en comparación con lo publicado hasta el momento es la determinación de un punto de corte de reducción de la VAF discriminador de pronóstico en términos de supervivencia libre de progresión. Este porcentaje, calculado en el 84.75% en la cohorte de descubrimiento, resultó como el punto de corte óptimo en la cohorte de validación. De este modo, comparándolo frente a un modelo en el que se utilice como marcador de pronóstico la total negativización de la VAF de *KRAS*, nuestro modelo (reducción de al menos un 84.75%) funcionaría mejor en términos de AIC (65.61 para la negativización completa vs 54.41 en nuestro modelo) y C-index (0.709 (se:0.039) y 0.791 (se:0.059), respectivamente). Además, cuando integramos este factor dentro de un análisis multivariado, fue el único que se mantuvo como discriminador de forma estadísticamente significativa, lo que lo reafirma como un buen predictor. Este porcentaje de reducción tan alto si lo comparamos con puntos de corte calculados en otros tumores digestivo como determinantes de pronóstico (201), posiblemente se deba al momento en el que recogimos la primera muestra de seguimiento. Mientras

en este trabajo la primera muestra de monitorización se tomó aproximadamente a los dos meses de iniciar tratamiento, en cáncer colorrectal se estimó el punto de corte de reducción de VAF discriminador de respuesta en un 30% a las 4 semanas de inicio de tratamiento. En otro estudio en adenocarcinoma de páncreas que comparó la cinética de *KRAS* en términos de negativización según la respuesta al tratamiento, hallaron el día 14 como el momento óptimo para una valoración temprana (120). La determinación de los puntos de corte de estos porcentajes de cambio en la VAF de *KRAS* como predictores de respuesta y el momento en el que se determinan de forma óptima probablemente debería integrarse dentro de los diseños de los ensayos clínicos. De este modo, podrían ayudar en la toma de decisiones terapéuticas, evitando tratamientos que puedan ser fútiles y/o excesivamente tóxicos en pacientes en los que la finalidad del tratamiento sigue siendo paliativa. Al mismo tiempo, estas cinéticas podrían ser de utilidad para la toma de decisiones en aquellos casos en los que la valoración radiológica de la respuesta sea difícil por tratarse de enfermedad no medible o en casos de respuestas disociadas.

Por otro lado, a pesar de la alta prevalencia de las mutaciones de *KRAS* en los tumores pancreáticos, no debemos olvidar que no están presentes en todos los tumores y que en algunos pacientes estas mutaciones no se detectan en ctDNA pese a estar presentes en el tumor. En nuestro caso concreto, en 20 de los 80 pacientes (25%) no detectamos mutaciones de *KRAS*, por lo que este método no nos serviría para monitorizar respuesta. En estos casos la identificación de otras alteraciones en tejido y en ctDNA nos permitiría poder realizar un seguimiento de estas anomalías moleculares y cuantificarlas de igual forma con el objetivo de predecir respuestas a tratamiento.

4. Evaluación de la génesis de modelos de organoides de adenocarcinoma de páncreas humano a partir de muestras obtenidas en piezas de pancreatectomía (objetivo 4).

En el grupo de pacientes que se consideraron resecables, al diagnóstico o tras respuesta a quimioterapia neoadyuvante, intentamos el establecimiento de organoides como modelo preclínico para caracterización de la enfermedad y realizar pruebas de sensibilidad a fármacos.

Tal y como se detalla en la parte de materiales y métodos, de las 29 piezas de pancreatectomía llevadas a cabo en el grupo de pacientes no metastásicos, en 18 casos obtuvimos tejido tumoral en fresco seleccionado por un patólogo experto con el propósito de realizar el cultivo de organoides. De estos 18 pacientes, el 38.9 % había recibido tratamiento neoadyuvante (7/18) y el resto se intervinieron sin tratamiento previo. Las características de estos casos se recogen en la tabla 14.

En la siguiente página

Tabla 14. Características clínico-patológicas de los casos recogidos para la generación de organoides. Viab: viabilidad de organoide. Neoady: tratamiento neoadyuvante recibido. TNM: estadiaje según clasificación TNM patológico. E: estadio anatomopatológico (según la clasificación TNM). Resec: tipo de resección (R0, R1 o R2). GH: grado histológico. L/V/PNI: invasión linfática/vascular/perineural (+=presente, -= ausente). t: tiempo hasta la recaída o supervivencia libre de enfermedad en días (en aquellos sin evidencia de recidiva a 31 de diciembre de 2022). GA: gemcitabina + nab-paclitaxel. GC: gemcitabina + capecitabina. QRT: quimiorradioterapia con capecitabina. 1L: primera línea de tratamiento paliativo. NA: no aplica (persistencia de enfermedad tras cirugía, resección no curativa). * Paciente fallecida por otras causas

PTOs	Características clínico-patológicas de paciente/ tumor							
	Código	Viab.	Neoady.	TNM (E)	Resec	GH	L/V/ PNI	Adyuvancia
PTO1	NO	Ninguno	T4N2(III)	R1	2	-/+	FOLFIRINOX	SI (316)
PTO2	NO	FOLFIRINOX	T2N2(III)	R0	2	+/+	FOLFIRINOX	SI (252)
PTO3	NO	FOLFIRINOX	T3N2(III)	R1	2	+/+	Ninguno	SI (101)
PTO4	NO	Ninguno	T1N1(IIB)	R0	2	-/+	FOLFIRINOX	SI (862)
PTO5	NO	GA+QRT	T3N1(IIB)	R1	3	+/+	Ninguno	NO(147)*
PTO6	NO	Ninguno	T2N1(IIB)	R0	2	-/+	Ninguno	SI (120)
PTO7	SI	Ninguno	T1N2(III)	R2	2	+/+	GA (1L)	NA
PTO8	NO	FOLFIRINOX	T2N1(IIB)	R0	2	+/+	Ninguno	SI (223)
PTO9	SI	Ninguno	T2N0 (IB)	R0	2	+/+	GC	NO (806)
PTO10	NO	FOLFIRINOX	T2N2(III)	R1	2	+/+	Gemcitabina	SI (92)
PTO11	NO	Ninguno	T2N1(IIB)	R1	2	+/+	Ninguno	NO (464)
PTO12	NO	Ninguno	T2N0 (IB)	R0	2	+/+	Gemcitabina	SI (257)
PTO13	SI	FOLFIRINOX	T2N0 (IB)	R0	2	-/-	Ninguno	NO (593)
PTO14	NO	Ninguno	T2N0 (IB)	R1	2	-/-	FOLFIRINOX	SI (487)
PTO15	NO	Ninguno	T2N1(IIB)	R1	2	+/+	FOLFIRINOX	NO (561)
PTO16	SI	Ninguno	T3N2(III)	R1	2	-/-	GA (1L)	SI (53)
PTO17	NO	GA	T2N0 (IB)	R0	2	-/-	Ninguno	NO (324)
PTO18	SI	Ninguno	T1N0(IA)	R0	1	-/-	FOLFIRINOX	NO (253)

En cinco de los dieciocho casos se consiguieron cultivar organoides viables a partir de este material tumoral en fresco, lo que supone un 28 % de tasa de éxito en muestras tumorales. De estos organoides establecidos con éxito, cuatro de los pacientes (80%) no habían recibido tratamiento quimioterápico previo a la cirugía y uno de ellos había sido tratado con FOLFIRINOX preoperatorio. Esto supone una eficacia de un 36.4% en pacientes no pretratados (4/11) y de 14.3% en casos que habían recibido quimioterapia (1/7). Adicionalmente, en los pacientes 13 y 16, se obtuvo material de tejido pancreático normal de estas mismas piezas de pancreatectomía y se generaron dos organoides como modelos no tumorales (PNO 13 y PNO 16), resultando uno de ellos viable (50% de tasa de éxito en muestras normales). Por tanto, si consideramos estas veinte muestras en su conjunto, 18 tumorales y 2 normales, nuestra tasa de éxito en el establecimiento de organoides global (PTOs y PNOs) fue de un 30 %, tal y como se muestra en la figura 25.

PDOs PÁNCREAS

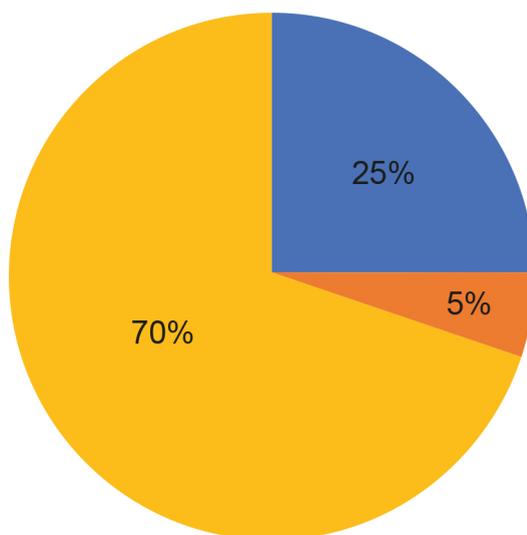
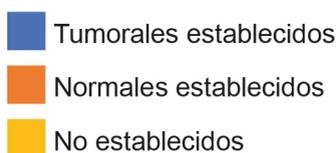


Figura 25. Gráfico circular representativo de la tasa de éxito en la generación de PDOs pancreáticos. En azul se representa el porcentaje de organoides tumorales derivados de pacientes (PTOs) viables con respecto al conjunto (5 de 20 muestras). Sombreados en naranja podemos ver el porcentaje de organoides de tejido normal derivado de pacientes (PNOs) viables sobre el total de muestras y, en amarillo, la proporción de muestras de las que no se lograron establecer organoides con viabilidad (14 de las 20 muestras).

En los cinco PTOs generados con éxito y sus tejidos parafinados pareados, realizamos estudio de WES para caracterizarlos molecularmente e intentar identificar alteraciones frente a las que pudiéramos aplicar tratamiento dirigido. Ente ellos, seleccionamos los dos casos que presentaban las mayores tasas de crecimiento para realizar ensayos de sensibilidad a fármacos: PTO9 y PTO16.

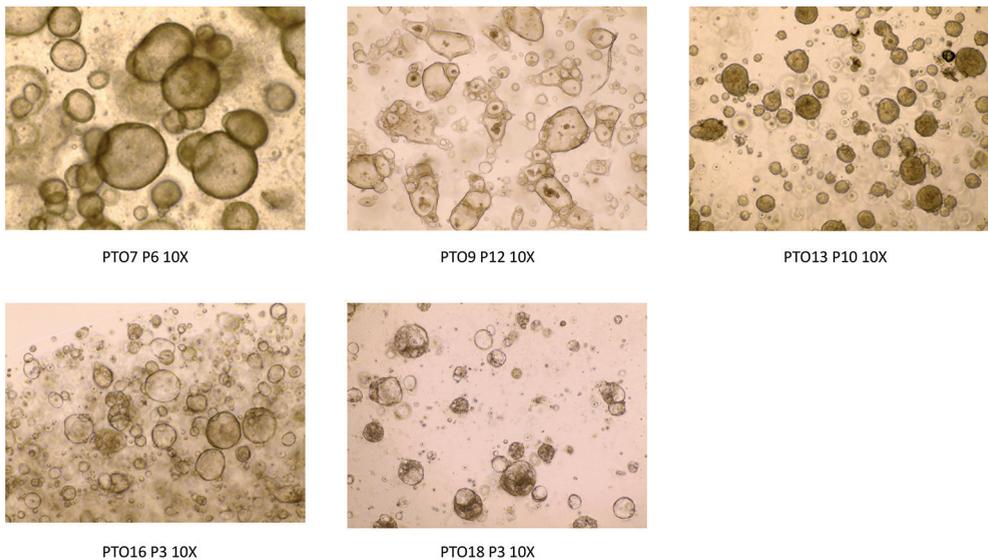


Figura 26. Imágenes del cultivo de los PTOs establecidos al microscopio en campo claro. Organoide tumoral del paciente 7 (PTO7) en el pase 6 (P6) en aumento 10X (A). PTO del paciente 9 en el pase 12 a 10X (B). Organoide tumoral del paciente 13 (PTO13) en el pase 10 (P10) y visión a 10X (C). Organoide tumoral del paciente 16 (PTO 16) en el pase 3 (P3) a 10X (D). Organoide tumoral del paciente 18 (PTO18) en el pase 3 (P3) en visión a 10X (E).

Caracterización molecular de los organoides y su tejido tumoral parafinado pareado mediante la secuenciación del exoma completo.

Una vez establecidos los organoides realizamos la secuenciación del exoma completo (WES) de éstos y de sus correspondientes tejidos tumorales parafinados archivados, comprobando así que el tejido seleccionado en fresco para la generación de los PTOs correspondía realmente a tejido tumoral.

Nuevamente el gen que más frecuentemente detectamos mutado en organoides fue *KRAS*, en el 80% de los casos, y de forma concordante con el tejido parafinado (cuatro de los cinco organoides y sus respectivos tejidos). En un 40% de las muestras detectamos mutaciones en *ATR* (dos PTOs y sus correspondientes PTTs), *SMAD4* (en PTT9 y PTO13) y *TP53* (en PTO13 y PTT16). Las mutaciones detectadas en los genes *ARID1A*, *CHEK2* y *FANCD2* estaban presentes sólo en un caso, pero lo estaban tanto en los PTOs como en sus PTTs pareados. En el caso del paciente 9, encontramos una mutación en *SMAD4* y otra en *KDM6A* exclusivamente en tumor parafinado y no en su correspondiente organoide y, sin embargo, detectamos una mutación en *NUP93* que sólo estaba presente en PTO-9 pero no en PTT9. En PTT9 encontramos mutaciones en los genes *TP53*, *ARID1A*, *HLA-A1* y *KMT2D* que no estaban presentes en PTO9, mientras que en PTO13 hallamos mutaciones en *SMAD4*, *TP53*, *APC*, *KMT2C* y *NF1* ausentes en el tejido parafinado analizado del paciente 13. Todas estas mutaciones se pueden ver representadas en la figura 27.

De estas mutaciones oncogénicas según OncoKB, se seleccionaron aquellas frente a las que dicha base de datos identifica un tratamiento dirigido, es decir, potencialmente accionables (figura 28). Posteriormente, en los dos organoides con mayor tasa de crecimiento, testamos la sensibilidad a fármacos dirigidos de acuerdo a estas alteraciones moleculares detectadas, así como a distintos quimioterápicos utilizados en la práctica clínica habitual.

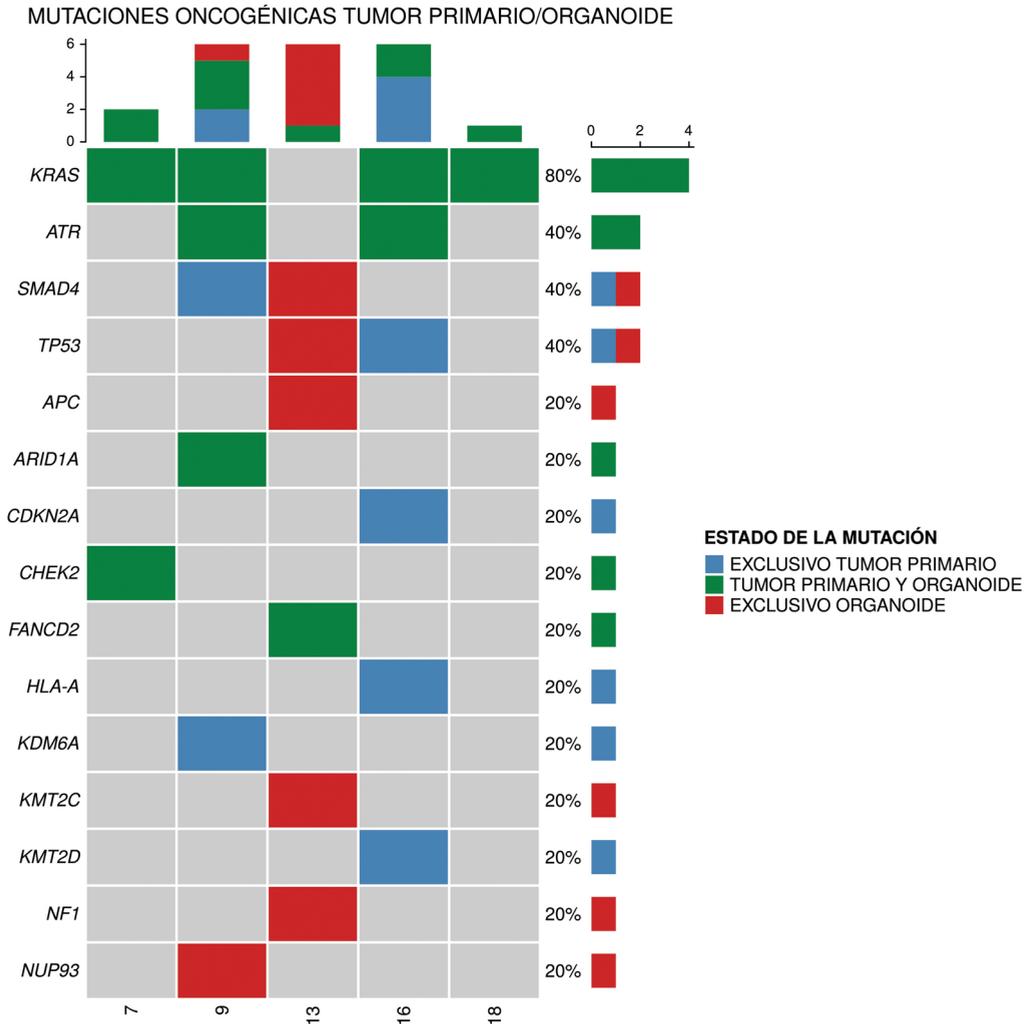


Figura 27. Gráfico representativo de las mutaciones (SNVs) patológicas detectadas mediante WES en los organoides tumorales y/o en sus correspondientes tejidos parafinados archivados. Los porcentajes del margen derecho indican el porcentaje de muestras con mutación en cada uno de los genes listados en el margen izquierdo. Cada columna representa a un paciente, numerado en la parte inferior de la columna. En verde se indican los genes en los que la SNV se detecta tanto en organoide (PTO) como en tumor (PTT). En rojo se representan los genes con mutación detectada sólo en organoide y, en azul, aquellos genes mutados sólo en tejido tumoral parafinado. Aparecen en gris los casos en los que no se detecta mutación en ese gen ni en PTO ni PTT. En la parte superior se indica el número de genes mutados en cada uno de los casos, con el mismo código de colores.

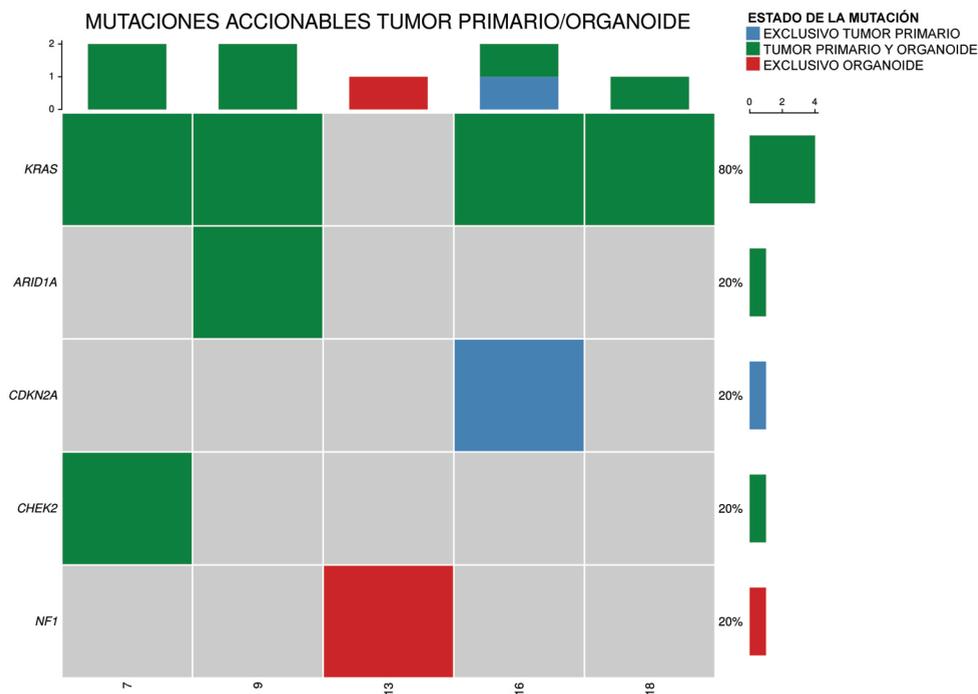


Figura 28. Gráfico representativo de las mutaciones (SNVs) oncogénicas potencialmente accionables según OncoKB en PTOs y/o PTTs. En el margen derecho se indica el porcentaje de muestras con mutación en cada uno de los genes listados en el margen izquierdo. Cada columna representa a un caso, con su respectivo número de paciente en la base. En verde se indican los genes en los que la SNV se detecta tanto en organoide (PTO) como en tejido (PTT), en rojo, el gen mutado sólo en PTO13 y; en azul, el gen mutado sólo en PTT16. Aparecen en gris los casos en los que no se detecta mutación en ese gen ni en PTO ni PTT. En la parte superior se indica el número de genes mutados en cada uno de los casos, con el mismo código de colores.

En la siguiente tabla se especifican las mutaciones detectadas en cada uno de los genes identificados como potencialmente accionables según OncoKB (*KRAS*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *CHEK2* y *NF1*), así como los fármacos indicados para su inhibición y la proporción en la que se presentó esta mutación en los PTOs y/o PTTs, o fracción alélica mutada (tabla 15).

GEN	CONSECUENCIA	HGVSp	FÁRMACO (ONCOKB)	PTT (VAF)	PTO (VAF)
<i>ARID1A</i>	Variante frameshift	p.Pro224ArgfsTer8	PLX2853 Tazemetostat	9 (0.4048)	9 (0.9407)
<i>CDKN2A</i>	Variante missense	p.Asp84Asn	Abemaciclib Ribociclib Palbociclib	16 (0.1286)	
<i>CHEK2</i>	Variante missense	p.Lys373Glu	Olaparib	7 (0.0263)	7 (0.055)
<i>KRAS</i>	Variante missense	p.Gly12Asp	MTRX1133 Binimetinib Trametinib Cobimetinib	7 (0.0169) 9 (0.1192) 16 (0.0921) 18 (0.0755)	7 (0.4603) 9 (0.4755) 16 (0.2537) 18 (0.1649)
<i>KRAS</i>	Variante missense	p.Gly12Val	Binimetinib Trametinib Cobimetinib		16 (0.1685)
<i>KRAS</i>	Variante missense	p.Gly12Arg	Binimetinib Trametinib Cobimetinib		16 (0.063)
<i>NFI</i>	Variante de splicing		Trametinib Cobimetinib Selumetinib		13

Tabla 15. Resumen de las mutaciones potencialmente accionables según OncoKB detectadas en los casos con PTOs estudiados. En la primera columna se enumeran los genes en los que se detectan las mutaciones y en segunda y tercera columnas la consecuencia génica y la nomenclatura HGVS del gen respectivamente. En la columna Fármaco se recogen los tratamientos que bloquearían estas dianas terapéuticas según la base de datos OncoKB. En las dos columnas de la derecha se indican los casos en los que se detectan estas alteraciones y en qué fracción alélica en tejido (PTT) y/o en organoide (PTO). VAF: Fracción alélica mutada

Ensayos de sensibilidad a fármacos antineoplásicos.

Como última prueba de la utilidad de los organoides como modelos preclínicos testamos, en PTO 9 y PTO 16, la sensibilidad a distintos quimioterápicos de eficacia clínica probada y uso rutinario en adenocarcinoma de páncreas, así como a tratamientos diana de acuerdo a los resultados de los estudios de WES en dichos organoides y sus respectivos tejidos tumorales. En base a estas sensibilidades, podríamos tomar decisiones a la hora de la elección del tratamiento en el paciente del que proviene el tumor a partir del que generamos el organoide con, a priori, mayor expectativa de respuesta.

En el caso del organoide PTO9, la combinación de gemcitabina con paclitaxel o el paclitaxel conseguirían reducir la viabilidad celular a unas concentraciones más bajas frente al resto, seguidos de gemcitabina en monoterapia y SN-38, metabolito activo de irinotecan. Por el contrario, 5FU oxaliplatino y su combinación, requerirían de unas concentraciones mucho mayores para poder conseguir reducir la viabilidad celular tumoral, tal y como podemos ver representado en la figura 29. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que esto puede no estar directamente relacionado con mayor actividad antitumoral de uno frente a otro fármaco, ya que tienen características farmacodinámicas y farmacocinéticas distintas.

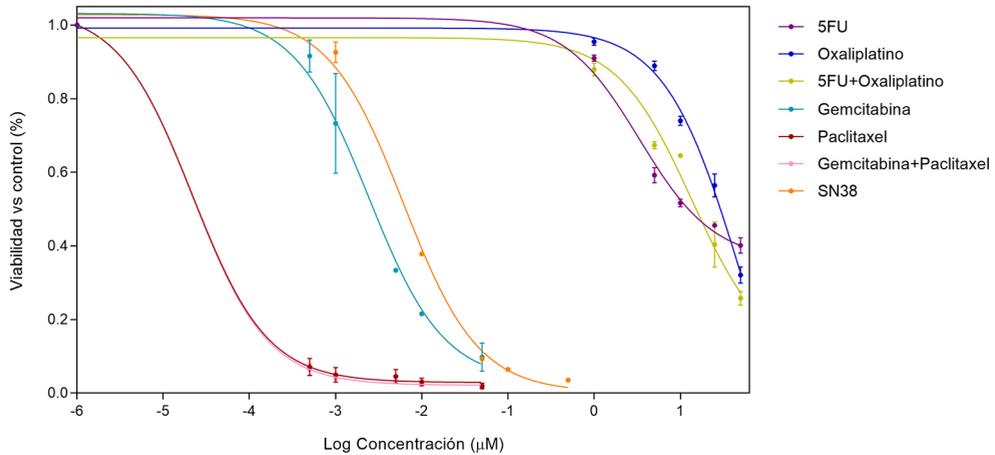


Figura 29. Ensayo de viabilidad celular frente a control sin tratamiento en organoide PTO9 tras la exposición a concentraciones crecientes de distintas quimioterapias citotóxicas. 5FU: 5-fluorouracilo.

De acuerdo a los resultados que obtuvimos del WES de PTO9 y PTT9, los fármacos capaces de bloquear *KRAS* y *ARID1A*, tendrían un potencial efecto terapéutico en este tumor. En base a ello, decidimos testar la sensibilidad del organoide a Trametinib (inhibidor de MEK, componente de la vía de las MAPK, en la que también está implicado *KRAS*) y dos fármacos con actividad frente a mutaciones de *ARID1A*: Olaparib (inhibidor de PARP) y Ceralasertib (inhibidor de ATR). Adicionalmente, hicimos test de sensibilidad al inhibidor de ciclinas Palbociclib, que podría tener acción frente a mutaciones de *CDKN2A*, alteración no detectada en este organoide ni en su tejido tumoral parafinado. En la figura 30 se representan las gráficas de sensibilidad a estas drogas.

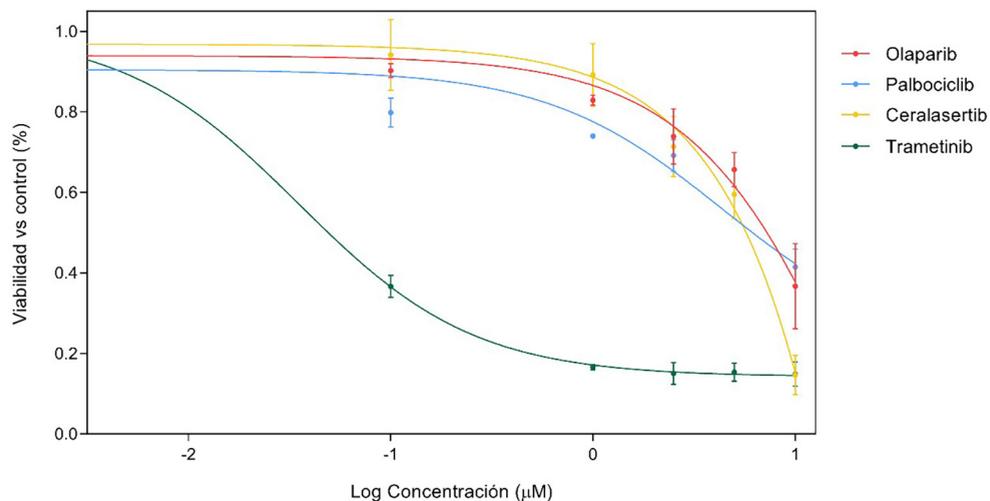


Figura 30. Ensayo de viabilidad celular frente a control sin tratamiento en organoide PTO9 tras la exposición a concentraciones crecientes de diferentes fármacos dirigidos.

De forma análoga a los experimentos realizados en PTO9, en el organoide PTO16 también realizamos estudios de sensibilidad a distintos fármacos quimioterápicos clásicos y a terapia dirigida, como se puede ver en las figuras 31 y 32, respectivamente.

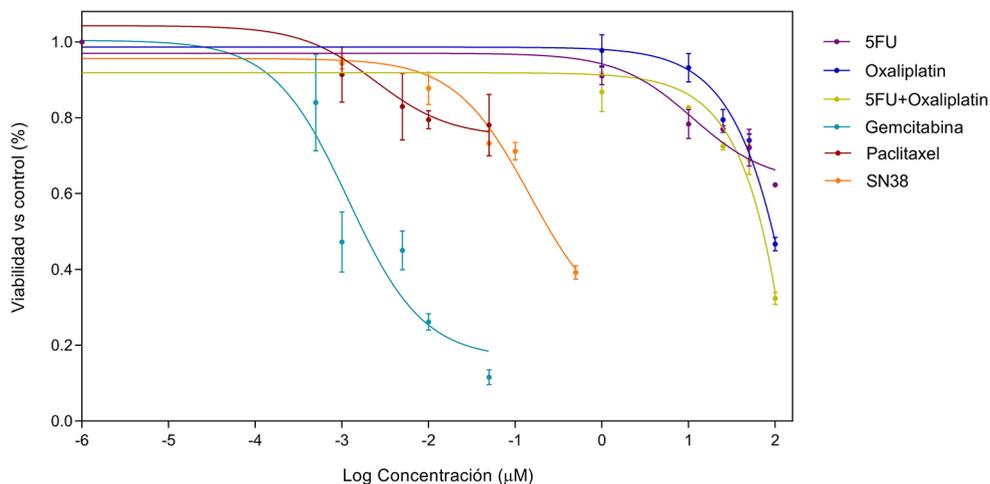


Figura 31. Ensayo de viabilidad celular frente a control sin tratamiento en organoide PTO16 tras la exposición a concentraciones crecientes de quimioterapias citotóxicas. 5FU: 5-fluorouracilo.

En este caso, el quimioterápico con el que claramente se logró una mayor reducción de la viabilidad celular con menores concentraciones de fármaco fue gemcitabina. Se precisó de mayores concentraciones de quimioterápicos para reducir la proliferación celular cuando se aplicaron paclitaxel y SN-38, con necesidad de concentraciones todavía mayores para reducir viabilidad celular en el caso de 5FU, oxaliplatino y su combinación (figura 31).

Igualmente, testamos la viabilidad celular de los organoides con terapia dirigida de acuerdo a los resultados obtenidos tras el estudio de WES de PTO y PTT del paciente 16. Nuevamente pudimos ver una mayor reducción de la viabilidad celular con menores dosis de droga cuando empleamos trametinib. En este caso no detectamos ninguna otra alteración accionable en PTO16, pero sí se encontró una mutación en *CDKN2A* en PTT16, que podría conferir sensibilidad a inhibidores de ciclinas según OncoKB, por lo que fue testada la sensibilidad a palbociclib en los organoides. Como podemos ver en la figura 32, este fármaco no consiguió un claro control del crecimiento celular, como tampoco lo hizo el inhibidor de ATR ceralasertib. El inhibidor de PARP olaparib redujo la viabilidad celular a concentraciones más altas que trametinib.

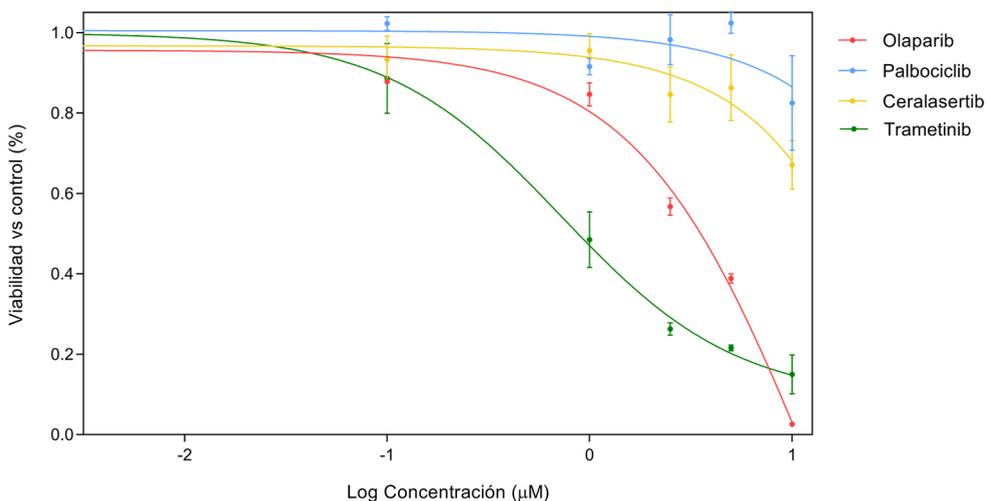


Figura 32. Ensayo de viabilidad celular frente a control sin tratamiento en organoide PTO16 tras la exposición a concentraciones crecientes de distintos fármacos dirigidos.

Si comparamos la sensibilidad a los distintos tratamientos entre ambos organoides, globalmente pudimos observar un requerimiento de menores concentraciones de fármacos para inhibir el crecimiento celular (mayor sensibilidad) en PTO9 que en PTO16, como podemos ver en la figura 33. Esta diferencia es más clara y acusada en el caso de paclitaxel y trametinib, así como SN38 y palbociclib.

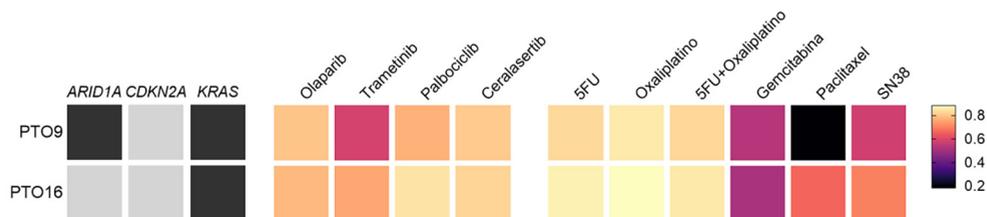


Figura 33. Heatmap representativo de las distintas sensibilidades farmacológicas de los organoides. La fila superior corresponde al organoide PTO9 y la inferior se refiere a PTO16. En el bloque de la izquierda, en las tres primeras columnas, en negro encontramos los genes con accionables mutados y en gris no mutados. Las siguientes columnas representan la sensibilidad a los diferentes fármacos testados en cada organoide, indicando el color las distintas AUC normalizadas (siendo más oscuro más sensible y más claro más resistente).

Discusión del objetivo 4

La generación de organoides derivados de tumor, estructuras tridimensionales que reproducen de forma más fidedigna las características morfológicas y moleculares que los cultivos celulares tradicionales, está surgiendo como herramientas clave para el estudio de la biología tumoral y las potenciales respuestas a tratamiento en diversos tipos de cáncer, incluido el adenocarcinoma de páncreas (155,161,202,203).

Como método alternativo y complementario a la biopsia líquida para la medicina de precisión, en nuestro trabajo propusimos el desarrollo de organoides de adenocarcinoma de páncreas a partir de muestras provenientes de pancreatectomía en otro subgrupo diferente de pacientes con tumores no metastásicos. Nuestro porcentaje de éxito o viabilidad fue menor al descrito en otros trabajos (155,161,162,204),

sobre todo en el subgrupo de pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico previo a la cirugía. No obstante, tenemos que considerar que pese a la experiencia del grupo en la generación de organoides en otros tipos tumorales como cáncer de colon (205), se trata de las primeras muestras de cáncer de páncreas a partir de las que nuestro laboratorio ha intentado generar organoides. Probablemente, en los casos que recibieron tratamiento previo a la cirugía, la dificultad para la identificación por parte del patólogo del área tumoral por los cambios fibróticos inducidos por la quimioterapia y un menor porcentaje de células tumorales viables influyen en la menor tasa de éxito. Para mejorar estas tasas de viabilidad, algunos grupos generan los organoides tras la formación de xenografts con la muestra tumoral inicial, por su mayor cantidad y porcentaje celular tumoral en la muestra (206).

En los 5 organoides, morfológicamente de apariencia tumoral y considerados viables, realizamos WES de forma pareada con las muestras de tejido tumoral parafinado que se obtuvieron también durante la pancreatometomía. De forma global, vimos una buena concordancia entre los organoides y sus correspondientes tejidos. En los pacientes 7 y 18 detectamos exactamente el mismo patrón de mutaciones patogénicas (en *KRAS* en ambos y *CHECK2* tanto en PTT7 como PTO7). En el caso del paciente 13, que fue el único paciente que había recibido neoadyuvancia en el que se generó organoide, el estudio de secuenciación sólo detectó un gen comúnmente mutado en tejido y organoide: *FANCD2*, hallando el resto de mutaciones de forma aislada en organoide y no en tejido (*TP53*, *SMAD4*, *APC*, *KMT2C* y *NFI*). A su vez, fue el único caso en el que en nuestro estudio mediante WES no detectamos ninguna mutación en *KRAS*. En los otros dos pacientes restantes, 9 y 16, vimos una concordancia entre organoide y su respectivo tejido parafinado del 80 y 73.3% si consideramos estos 15 genes patogénicos representados en la gráfica (12/15 y 11/15, respectivamente). Estas diferencias de resultados muy probablemente reflejen la heterogeneidad intratumoral que, asociada al alto porcentaje de fibrosis y menor pureza de celularidad tumoral en las piezas de pancreatometomía frente a los organoides, podrían generar estas discrepancias.

La caracterización molecular, no sólo tiene importancia por su utilidad para conocer las alteraciones patogénicas y vías implicadas en el desarrollo tumoral, sino que también pueden tener una aplicación incluso más relevante al permitirnos identificar aquellas alteraciones con potenciales tratamientos dirigidos o que puedan predecir respuesta a terapia. En el caso de los organoides, al ser un modelo *in vitro*, podemos testar la sensibilidad a fármacos de uso habitual en la práctica clínica y aquellos dirigidos frente a las alteraciones moleculares accionables detectadas en el estudio de WES. Nuestros dos organoides sobre los que realizamos test farmacológicos tenían mutaciones en *KRAS* (concretamente los dos G12D y el PTO16 además las mutaciones G12V y G12A), gen considerado no targetable hasta hace muy poco tiempo, pero en el que se están desarrollando inhibidores que están ya en fase de ensayo clínico (135,136). Al no disponer de estos inhibidores, testamos la sensibilidad a trametinib, inhibidor de MEK1/MEK2 y por tanto potencial inhibidor indirecto de *KRAS* cuya eficacia se ha probado en ensayos clínicos (207,208). En ambos organoides este fármaco fue el que consiguió mayor inhibición celular a concentraciones más bajas que otras drogas dirigidas, probablemente como reflejo de mejor respuesta al fármaco como consecuencia de bloquear esta vía de proliferación celular que sabíamos estaba alterada en nuestros organoides. La otra mutación potencialmente accionable según OncoKB que detectamos fue en el gen *ARID1A*, presente sólo en PTO9. Al testar la sensibilidad de nuestros organoides a ceralasertib, inhibidor de ATR que ha demostrado mayor eficacia en tumores con alteraciones de ARID1A (209), observamos que PTO9 sería más sensible que PTO16, probablemente por presentar mutación en dicho gen.

Al margen de la respuesta a tratamientos dirigidos, también evaluamos la sensibilidad de nuestros organoides a quimioterapia utilizada en la práctica estándar, aunque no nos sirvió para la toma de decisiones terapéuticas. A excepción de gemcitabina, a la PTO16 fue ligeramente más sensible que PTO9, la concentración de los fármacos necesaria para conseguir la misma reducción de viabilidad celular fue menor en PTO9, sobre todo en el caso de paclitaxel. En el contexto en el que

se generaron estos organoides, tumores resecados, estos test de sensibilidad a quimioterapia podrían tener gran valor para la elección del esquema de quimioterapia adyuvante. En el momento actual, los pacientes reciben preferentemente mFOLFIRINOX, frente a la combinación de gemcitabina con capecitabina o gemcitabina en monoterapia, por sus mejores resultados en términos de SG y SLP. Sin embargo, la decisión entre dichos tratamientos se basa en factores clínicos, ya que no disponemos de biomarcadores que nos asistan en la elección del esquema idóneo para cada paciente, ni tampoco una comparación directa de mFOLFIRINOX y gemcitabina-capecitabina. La posibilidad de testar la sensibilidad a estos fármacos en el transcurso del post-operatorio para poder elegir el tratamiento adyuvante óptimo probablemente mejoraría los resultados.

En el caso concreto de la paciente de la que procedía PTO9, se administró tratamiento adyuvante con gemcitabina y capecitabina, permaneciendo libre de enfermedad en el momento de corte de datos, por lo que no podemos hacer una comparativa directa con la respuesta a tratamiento en la clínica. En cambio, el paciente del que derivaba PTO16, presentó una recaída hepática inmediatamente tras la cirugía, por la que recibió quimioterapia de primera línea con gemcitabina+nab-paclitaxel (con estabilidad de enfermedad como mejor respuesta y una SLP de 8 meses), segunda línea con irinotecan liposomal+ 5FU (SLP 2 meses, con progresión en primer TAC) y llegó a iniciar una tercera línea con FOLFOX, de la que sólo pudo recibir un ciclo por deterioro clínico, progresión radiológica tras el mismo y exitus (supervivencia desde el momento de la enfermedad metastásica de 11 meses). Aunque las decisiones de tratamiento se tomaron en base a las recomendaciones de las guías clínicas y lo esperable en este contexto es que la respuesta sea mejor y de mayor duración con gemcitabina+nab-paclitaxel frente a las posteriores, en los test farmacológicos que se realizaron en PTO 16 también pudimos ver una mayor sensibilidad a gemcitabina frente al resto de quimioterápicos, por lo que podríamos decir que concordarían las respuestas a nivel clínico y experimental.

Pese a todas estas ventajas o aplicaciones potenciales de los organoides, todavía existen limitaciones que hacen difícil su uso en la práctica clínica rutinaria. Una de ellas sería la dificultad técnica de generación de organoides, con altos costes y requerimientos estructurales que hacen que no puedan desarrollarse fuera de laboratorios dotados para ello. Además, el tiempo necesario para completar todo el proceso dificulta la aplicabilidad en pacientes, sobre todo en el escenario de la enfermedad metastásica, donde los pacientes se pueden deteriorar con gran rapidez sin tratamiento. También sería necesario una mayor evidencia científica y estandarización de las técnicas para su uso en la clínica. En cualquier caso, los organoides se posicionan claramente como otra herramienta de utilidad y muy prometedora para el desarrollo de la medicina de precisión en adenocarcinoma de páncreas.

CONCLUSIONES

1. El estudio mediante secuenciación completa del exoma de tejido tumoral parafinado de pacientes con adenocarcinoma de páncreas metastásico detecta mutaciones patogénicas o potencialmente patogénicas:

1.1 A nivel somático, fundamentalmente en *KRAS* (90%), *TP53* (50%) y *CDKN2A* (20%).

1.2 Accionables como diana terapéutica potencial en *KRAS*^{G12D}, *BRC1A1*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MTOR*, *EZH2* y *SF3B1*.

1.3 Germinales, tras la adición de la secuenciación de células mononucleadas de sangre periférica, en los genes *TP53*, *RECQL4* y *AXINI1*.

2. La secuenciación completa del exoma de ctDNA de pacientes con adenocarcinoma de páncreas metastásico:

2.1 Concuerda en un 20% con su tejido pareado, captando mejor la heterogeneidad tumoral.

2.2 Presenta una mayor sensibilidad para la detección de alteraciones moleculares accionables que el análisis con un panel limitado de genes o el estudio únicamente del tumor

2.3 Identifica un enriquecimiento en genes de la vía de regulación negativa de los componentes de organización celular en pacientes con supervivencia menor a 11 meses, frente a mutaciones en genes de la vía de regulación y reparación del DNA, exclusivas de pacientes de mayor supervivencia.

3.1 La detección de mutaciones de *KRAS* en plasma mediante ddPCR al diagnóstico condiciona una peor supervivencia libre de progresión.

3.2 Los pacientes con negativización completa de *KRAS* en plasma o reducción de fracción alélica mutada tras el tratamiento mayor al 84.75% presentan una mejor supervivencia libre de progresión.

4. Los organoides generados a partir de tejido en fresco de pancreatectomías presentan características morfológicas y moleculares análogas al tumor, permiten identificar tratamientos dirigidos y testar la sensibilidad fármacos, que probablemente puedan predecir la respuesta a tratamiento en la práctica clínica.

RESUMEN

El adenocarcinoma de páncreas es el tumor sólido de peor pronóstico y su incidencia está en aumento en los últimos años en los países desarrollados, lo que lo convierte en un problema fundamental de salud pública. Este mal pronóstico en gran parte viene condicionado por su presentación habitual como enfermedad avanzada o metastásica y las escasas alternativas terapéuticas con limitados avances en el tratamiento, que tienen escaso impacto en términos de supervivencia. Estos tratamientos, a excepción de olaparib en los pocos casos que presentan mutaciones germinales de BRCA, se seleccionan generalmente en base a criterios clínicos, no guiados por biomarcadores predictivos de respuesta. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de la medicina de precisión en este tumor es la dificultad del acceso a muestras en cantidad y calidad óptimas para su caracterización molecular en casos no resecables, por lo que en este contexto sería de gran utilidad la aplicación de la biopsia líquida. En aquellos casos con acceso a muestras tumorales, otra herramienta de gran utilidad para el desarrollo de medicina personalizada es la génesis de organoides como modelos preclínicos funcionales que permiten, no sólo la caracterización molecular tumoral, sino también evaluar la respuesta al tratamiento.

El análisis de ADN tumoral circulante (ctDNA), uno de los subtipos de biopsia líquida, en el contexto de enfermedad avanzada nos ofrecería de un modo relativamente fácil y poco invasivo dos ventajas fundamentales para el desarrollo de tratamientos personalizados en adenocarcinoma de páncreas: la caracterización molecular del tumor y la monitorización de su evolución durante el tratamiento. Con estas premisas, el objetivo fundamental de este trabajo es describir las alteraciones genómicas mediante secuenciación del exoma completo (WES) de una cohorte de 37 pacientes con adenocarcinoma de páncreas metastásico en tejido y, fundamentalmente en plasma, identificando aquellas germinales y somáticas con potencial patogénico, predictivo de respuesta y con valor pronóstico. Adicionalmente, mediante una técnica de mayor sensibilidad como es la ddPCR, se pretende evaluar el valor pronóstico

de la detección de *KRAS* en plasma al diagnóstico y en su monitorización en el momento de la respuesta en estos pacientes y en una cohorte de validación con 43 casos con características clínicas comparables.

Por otro lado, el desarrollo de organoides o cultivos celulares tridimensionales a partir de tejido tumoral en fresco, nos permitiría, además de la caracterización de alteraciones moleculares con potencial tratamiento dirigido, un estudio funcional mediante el test *in vitro* de la sensibilidad del organoide a distintos fármacos antitumorales. Con todo ello, nuestro trabajo tiene como propósito cultivar organoides a partir de tejido tumoral procedente de pancreatectomías de pacientes con tumores resecables, su caracterización molecular identificando dianas terapéuticas y realizar test de sensibilidad farmacológicos que puedan predecir respuesta a tratamiento en la clínica.

Con todo ello, se pretende integrar el uso de la biopsia líquida y organoides como métodos de diagnóstico y funcionales para la aplicación de la medicina personalizada en adenocarcinoma de páncreas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 15 de agosto de 2021;149(4):778-89.
2. Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM, Nead KT. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open*. 7 de abril de 2021;4(4):e214708.
3. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. 2019;10(1):10-27.
4. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del Cáncer en España 2023. [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://seom.org/images/Las_cifras_del_Cancer_en_Espana_2023.pdf
5. Sung H, Siegel RL, Rosenberg PS, Jemal A. Emerging cancer trends among young adults in the USA: analysis of a population-based cancer registry. *Lancet Public Health*. marzo de 2019;4(3):e137-47.
6. Gaddam S, Abboud Y, Oh J, Samaan JS, Nissen NN, Lu SC, et al. Incidence of Pancreatic Cancer by Age and Sex in the US, 2000-2018. *JAMA*. 23 de noviembre de 2021;326(20):2075.
7. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. enero de 2023;73(1):17-48.
8. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol*. 1 de julio de 2012;23(7):1880-8.
9. Wang YT, Gou YW, Jin WW, Xiao M, Fang HY. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer*. 12 de marzo de 2016;16(1):212.
10. Johansen D, Stocks T, Jonsson H, Lindkvist B, Björge T, Concini H, et al. Metabolic Factors and the Risk of Pancreatic Cancer: A Prospective Analysis of almost 580,000 Men and Women in the Metabolic Syndrome and Cancer Project. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 8 de septiembre de 2010;19(9):2307-17.
11. Connor AA, Gallinger S. Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes. *Surg Oncol Clin*. 1 de octubre de 2015;24(4):733-64.
12. Hu C, LaDuca H, Shimelis H, Polley EC, Lilyquist J, Hart SN, et al. Multigene Hereditary Cancer Panels Reveal High-Risk Pancreatic Cancer Susceptibility Genes. *JCO Precis Oncol*. 1 de noviembre de 2018;(2):1-28.
13. National Comprehensive Cancer Network. Pancreatic Adenocarcinoma (Version 2. 2023). [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/pancreatic.pdf
14. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression Model for Pancreatic Cancer. :5.
15. Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, Li Y, Wilson GW, Connor AA, et al. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature*. 20 de octubre de 2016;538(7625):378-82.
16. Makohon-Moore AP, Matsukuma K, Zhang M, Reiter JG, Gerold JM, Jiao Y, et al. Precancerous neoplastic cells can move through the pancreatic ductal system. *Nature*. septiembre de 2018;561(7722):201-5.
17. Hutchings D, Waters KM, Weiss MJ, Wolfgang CL, Makary MA, He J, et al. Cancerization of the Pancreatic Ducts: Demonstration of a Common and Under-recognized Process Using Immunolabeling of Paired Duct Lesions and Invasive Pancreatic Ductal Adenocarcinoma for p53 and Smad4 Expression. *Am J Surg Pathol*. noviembre de 2018;42(11):1556-61.
18. Cicens J, Kvederavičiute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A, Cicens J. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers*. 28 de abril de 2017;9(12):42.

19. Matsuda Y, Furukawa T, Yachida S, Nishimura M, Seki A, Nonaka K, et al. The Prevalence and Clinicopathological Characteristics of High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Autopsy Study Evaluating the Entire Pancreatic Parenchyma. *Pancreas*. junio de 2017;46(5):658-64.
20. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*. 7 de septiembre de 2021;326(9):851.
21. US Preventive Services Task Force. Screening for Pancreatic Cancer: US Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement. *JAMA*. 6 de agosto de 2019;322(5):438-44.
22. Goggins M, Overbeek KA, Brand R, Syngal S, Del Chiaro M, Bartsch DK, et al. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. *Gut*. enero de 2020;69(1):7-17.
23. Walter FM, Mills K, Mendonça SC, Abel GA, Basu B, Carroll N, et al. Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 1 de diciembre de 2016;1(4):298-306.
24. Ducreux M, Cuhna ASa, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 1 de septiembre de 2015;26:v56-68.
25. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 22 de diciembre de 2016;2(1):16022.
26. Sohal DPS, Duong M, Ahmad SA, Gandhi NS, Beg MS, Wang-Gillam A, et al. Efficacy of Perioperative Chemotherapy for Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 1 de marzo de 2021;7(3):421.
27. Versteijne E, Suker M, Groothuis K, Akkermans-Vogelaar JM, Besselink MG, Bonsing BA, et al. Preoperative Chemoradiotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Results of the Dutch Randomized Phase III PREOPANC Trial. *J Clin Oncol*. 1 de junio de 2020;38(16):1763-73.
28. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 12 de mayo de 2011;364(19):1817-25.
29. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med*. 31 de octubre de 2013;369(18):1691-703.
30. Wainberg ZA, Melisi D, Macarulla T, Pazo Cid R, Chandana SR, De La Fouchardière C, et al. NALIRIFOX versus nab-paclitaxel and gemcitabine in treatment-naïve patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (NAPOLI 3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. octubre de 2023;402(10409):1272-81.
31. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 25 de julio de 2019;381(4):317-27.
32. Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin WC, Mansour J, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun*. noviembre de 2015;6(1):6744.
33. Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol*. abril de 2020;21(4):508-18.
34. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*. 12 de junio de 2009;324(5933):1457-61.

35. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*. 16 de junio de 2014;25(6):719-34.
36. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 16 de junio de 2014;25(6):735-47.
37. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 26 de septiembre de 2008;321(5897):1801-6.
38. The ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*. 6 de febrero de 2020;578(7793):82-93.
39. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. marzo de 2016;531(7592):47-52.
40. Connor AA, Denroche RE, Jang GH, Lemire M, Zhang A, Chan-Seng-Yue M, et al. Integration of Genomic and Transcriptional Features in Pancreatic Cancer Reveals Increased Cell Cycle Progression in Metastases. *Cancer Cell*. febrero de 2019;35(2):267-282.e7.
41. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med*. abril de 2011;17(4):500-3.
42. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SGH, Hoadley KA, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*. octubre de 2015;47(10):1168-78.
43. Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, Moffitt RA, Yeh JJ, Stewart C, et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*. agosto de 2017;32(2):185-203.e13.
44. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 26 de febrero de 2015;518(7540):495-501.
45. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras MC, Muthuswamy LB, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*. noviembre de 2012;491(7424):399-405.
46. Wang JD, Jin K, Chen XY, Lv JQ, Ji KW. Clinicopathological significance of SMAD4 loss in pancreatic ductal adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 7 de marzo de 2017;8(10):16704-11.
47. Qian ZR, Rubinson DA, Nowak JA, Morales-Oyarvide V, Dunne RF, Kozak MM, et al. Association of Alterations in Main Driver Genes With Outcomes of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol*. 8 de marzo de 2018;4(3):e173420.
48. McIntyre CA, Lawrence SA, Richards AL, Chou JF, Wong W, Capanu M, et al. Alterations in driver genes are predictive of survival in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*. septiembre de 2020;126(17):3939-49.
49. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. diciembre de 2003;4(6):437-50.
50. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Campbell PJ, Stratton MR. Deciphering Signatures of Mutational Processes Operative in Human Cancer. *Cell Rep*. enero de 2013;3(1):246-59.
51. Alexandrov LB, Jones PH, Wedge DC, Sale JE, Campbell PJ, Nik-Zainal S, et al. Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nat Genet*. diciembre de 2015;47(12):1402-7.
52. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Siu HC, Leung SY, Stratton MR. A mutational signature in gastric cancer suggests therapeutic strategies. *Nat Commun*. diciembre de 2015;6(1):8683.

53. Grant RC, Denroche R, Jang GH, Nowak KM, Zhang A, Borgida A, et al. Clinical and genomic characterisation of mismatch repair deficient pancreatic adenocarcinoma. *Gut*. octubre de 2021;70(10):1894-903.
54. Connor AA, Denroche RE, Jang GH, Timms L, Kalimuthu SN, Selander I, et al. Association of Distinct Mutational Signatures With Correlates of Increased Immune Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol*. 1 de junio de 2017;3(6):774-83.
55. Cortés-Ciriano I, Lee JJK, Xi R, Jain D, Jung YL, Yang L, et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nat Genet*. 2 de marzo de 2020;52(3):331-41.
56. Rashid NU, Peng XL, Jin C, Moffitt RA, Volmar KE, Belt BA, et al. Purity Independent Subtyping of Tumors (PurIST), A Clinically Robust, Single-sample Classifier for Tumor Subtyping in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*. 1 de enero de 2020;26(1):82-92.
57. Kim S, Kang M, Lee S, Bae S, Han S, Jang JY, et al. Identifying molecular subtypes related to clinicopathologic factors in pancreatic cancer. *Biomed Eng Online*. 2014;13 Suppl 2(Suppl 2):S5.
58. Janky R, Binda MM, Allemeersch J, Van den Broeck A, Govaere O, Swinnen JV, et al. Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 12 de agosto de 2016;16:632.
59. Mueller S, Engleitner T, Maresch R, Zukowska M, Lange S, Kaltenbacher T, et al. Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature*. 1 de febrero de 2018;554(7690):62-8.
60. Puleo F, Nicolle R, Blum Y, Cros J, Marisa L, Demetter P, et al. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology*. diciembre de 2018;155(6):1999-2013.e3.
61. Maurer C, Holmstrom SR, He J, Laise P, Su T, Ahmed A, et al. Experimental microdissection enables functional harmonisation of pancreatic cancer subtypes. *Gut*. junio de 2019;68(6):1034-43.
62. Chan-Seng-Yue M, Kim JC, Wilson GW, Ng K, Figueroa EF, O'Kane GM, et al. Transcription phenotypes of pancreatic cancer are driven by genomic events during tumor evolution. *Nat Genet*. 1 de febrero de 2020;52(2):231-40.
63. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. septiembre de 2008;14(9):985-90.
64. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med [Internet]*. 19 de febrero de 2014 [citado 18 de marzo de 2022];6(224). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3007094>
65. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin Chem*. 1 de enero de 2015;61(1):112-23.
66. Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res*. 1 de noviembre de 2015;21(21):4786-800.
67. Husain H, Velculescu VE. Cancer DNA in the Circulation: The Liquid Biopsy. *JAMA*. 3 de octubre de 2017;318(13):1272.
68. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 23 de febrero de 2018;359(6378):926-30.
69. Xie Z, Yin X, Gong B, Nie W, Wu B, Zhang X, et al. Salivary microRNAs Show Potential as a Noninvasive Biomarker for Detecting Resectable Pancreatic Cancer. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. febrero de 2015;8(2):165-73.
70. Terasawa H, Kinugasa H, Ako S, Hirai M, Matsushita H, Uchida D, et al. Utility of liquid biopsy using urine in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther*. 3 de octubre de 2019;20(10):1348-53.

71. Satoh K. Molecular Approaches Using Body Fluid for the Early Detection of Pancreatic Cancer. *Diagnostics*. 22 de febrero de 2021;11(2):375.
72. Zhou B, Xu JW, Cheng YG, Gao JY, Hu SY, Wang L, et al. Early detection of pancreatic cancer: Where are we now and where are we going?: Early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 15 de julio de 2017;141(2):231-41.
73. Lee J, Park SS, Lee YK, Norton JA, Jeffrey SS. Liquid biopsy in pancreatic ductal adenocarcinoma: current status of circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Mol Oncol*. agosto de 2019;13(8):1623-50.
74. Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics*. diciembre de 2019;13(1):34.
75. Postel M, Roosen A, Laurent-Puig P, Taly V, Wang-Renault SF. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev Mol Diagn*. 2 de enero de 2018;18(1):7-17.
76. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci*. 7 de junio de 2011;108(23):9530-5.
77. Rothé F, Laes JF, Lambrechts D, Smeets D, Vincent D, Maetens M, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol*. octubre de 2014;25(10):1959-65.
78. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. mayo de 2014;20(5):548-54.
79. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. *Sci Transl Med [Internet]*. 30 de mayo de 2012 [citado 18 de marzo de 2022];4(136). Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3003726>
80. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, et al. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol*. mayo de 2016;34(5):547-55.
81. Ståhlberg A, Krzyzanowski PM, Egyud M, Filges S, Stein L, Godfrey TE. Simple multiplexed PCR-based barcoding of DNA for ultrasensitive mutation detection by next-generation sequencing. *Nat Protoc*. abril de 2017;12(4):664-82.
82. Pécuchet N, Rozenholc Y, Zonta E, Pietrasz D, Didelot A, Combe P, et al. Analysis of Base-Position Error Rate of Next-Generation Sequencing to Detect Tumor Mutations in Circulating DNA. *Clin Chem*. 1 de noviembre de 2016;62(11):1492-503.
83. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer. *The Lancet*. junio de 2020;395(10242):2008-20.
84. Brychta N, Krahn T, von Ahnen O. Detection of KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Digital PCR in Early Stages of Pancreatic Cancer. *Clin Chem*. 1 de noviembre de 2016;62(11):1482-91.
85. Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU, Bernard V, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol*. abril de 2017;28(4):741-7.
86. Lee B, Lipton L, Cohen J, Tie J, Javed AA, Li L, et al. Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Ann Oncol*. septiembre de 2019;30(9):1472-8.
87. Wang ZY, Ding XQ, Zhu H, Wang RX, Pan XR, Tong JH. KRAS Mutant Allele Fraction in Circulating Cell-Free DNA Correlates With Clinical Stage in Pancreatic Cancer Patients. *Front Oncol*. 29 de noviembre de 2019;9:1295.
88. Sefrioui D, Blanchard F, Toure E, Basile P, Beaussire L, Dolfus C, et al. Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours. *Br J Cancer*. septiembre de 2017;117(7):1017-25.

89. Bernard V, Kim DU, San Lucas FA, Castillo J, Allenson K, Mulu FC, et al. Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*. enero de 2019;156(1):108-118.e4.
90. Buscaill L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. marzo de 2020;17(3):153-68.
91. Le Calvez-Kelm F, Foll M, Wozniak MB, Delhomme TM, Durand G, Chopard P, et al. KRAS mutations in blood circulating cell-free DNA: a pancreatic cancer case-control. *Oncotarget*. 29 de noviembre de 2016;7(48):78827-40.
92. Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, et al. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 19 de septiembre de 2017;114(38):10202-7.
93. Zhu Y, Zhang H, Chen N, Hao J, Jin H, Ma X. Diagnostic value of various liquid biopsy methods for pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. enero de 2020;99(3):e18581.
94. Okada T, Mizukami Y, Ono Y, Sato H, Hayashi A, Kawabata H, et al. Digital PCR-based plasma cell-free DNA mutation analysis for early-stage pancreatic tumor diagnosis and surveillance. *J Gastroenterol*. diciembre de 2020;55(12):1183-93.
95. Adamo P, Cowley CM, Neal CP, Mistry V, Page K, Dennison AR, et al. Profiling tumour heterogeneity through circulating tumour DNA in patients with pancreatic cancer. *Oncotarget*. 20 de octubre de 2017;8(50):87221-33.
96. Maire F, Micard S, Hammel P, Voitot H, Lévy P, Cugnenc PH, et al. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA. *Br J Cancer*. agosto de 2002;87(5):551-4.
97. Shen SY, Singhania R, Fehringer G, Chakravarthy A, Roehrl MHA, Chadwick D, et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature*. noviembre de 2018;563(7732):579-83.
98. Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV, Liu MC, et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol*. junio de 2020;31(6):745-59.
99. Cao F, Wei A, Hu X, He Y, Zhang J, Xia L, et al. Integrated epigenetic biomarkers in circulating cell-free DNA as a robust classifier for pancreatic cancer. *Clin Epigenetics*. diciembre de 2020;12(1):112.
100. Eissa MAL, Lerner L, Abdelfatah E, Shankar N, Canner JK, Hasan NM, et al. Promoter methylation of ADAMTS1 and BNC1 as potential biomarkers for early detection of pancreatic cancer in blood. *Clin Epigenetics*. diciembre de 2019;11(1):59.
101. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 20 de diciembre de 2018;379(25):2395-406.
102. Groot VP, Mosier S, Javed AA, Teinor JA, Gemenetzis G, Ding D, et al. Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*. 15 de agosto de 2019;25(16):4973-84.
103. Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, et al. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br J Cancer*. junio de 2016;115(1):59-65.
104. Watanabe F, Suzuki K, Tamaki S, Abe I, Endo Y, Takayama Y, et al. Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer. *Batra SK, editor. PLOS ONE*. 31 de diciembre de 2019;14(12):e0227366.
105. Lee JS, Rhee TM, Pietrasz D, Bachet JB, Laurent-Puig P, Kong SY, et al. Circulating tumor DNA as a prognostic indicator in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. diciembre de 2019;9(1):16971.

106. Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun.* noviembre de 2015;6(1):7686.
107. Pietrasz D, Pécuchet N, Garlan F, Didelot A, Dubreuil O, Doat S, et al. Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker. *Clin Cancer Res.* 1 de enero de 2017;23(1):116-23.
108. Nakano Y, Kitago M, Matsuda S, Nakamura Y, Fujita Y, Imai S, et al. KRAS mutations in cell-free DNA from preoperative and postoperative sera as a pancreatic cancer marker: a retrospective study. *Br J Cancer.* 6 de marzo de 2018;118(5):662-9.
109. Strijker M, Soer EC, Pastena M, Creemers A, Balduzzi A, Beagan JJ, et al. Circulating tumor DNA quantity is related to tumor volume and both predict survival in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* marzo de 2020;146(5):1445-56.
110. Chen H, Tu H, Meng ZQ, Chen Z, Wang P, Liu LM. K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol EJSO.* julio de 2010;36(7):657-62.
111. Tjensvoll K, Lapin M, Buhl T, Oltedal S, Steen-Ottosen Berry K, Gilje B, et al. Clinical relevance of circulating KRAS mutated DNA in plasma from patients with advanced pancreatic cancer. *Mol Oncol.* abril de 2016;10(4):635-43.
112. Van Laethem JL, Riess H, Jassem J, Haas M, Martens UM, Weekes C, et al. Phase I/II Study of Refametinib (BAY 86-9766) in Combination with Gemcitabine in Advanced Pancreatic cancer. *Target Oncol.* febrero de 2017;12(1):97-109.
113. Semrad T, Barzi A, Lenz HJ, Hutchins IM, Kim EJ, Gong IY, et al. Pharmacodynamic separation of gemcitabine and erlotinib in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: therapeutic and biomarker results. *Int J Clin Oncol.* junio de 2015;20(3):518-24.
114. Chen L, Zhang Y, Cheng Y, Zhang D, Zhu S, Ma X. Prognostic value of circulating cell-free DNA in patients with pancreatic cancer: A systemic review and meta-analysis. *Gene.* diciembre de 2018;679:328-34.
115. Mohan S, Ayub M, Rothwell DG, Gulati S, Kilerci B, Hollebecque A, et al. Analysis of circulating cell-free DNA identifies KRAS copy number gain and mutation as a novel prognostic marker in Pancreatic cancer. *Sci Rep.* diciembre de 2019;9(1):11610.
116. Toledano-Fonseca M, Cano MT, Inga E, Rodríguez-Alonso R, Gómez-España MA, Guil-Luna S, et al. Circulating Cell-Free DNA-Based Liquid Biopsy Markers for the Non-Invasive Prognosis and Monitoring of Metastatic Pancreatic Cancer. *Cancers.* 1 de julio de 2020;12(7):1754.
117. Kim MK, Woo SM, Park B, Yoon KA, Kim YH, Joo J, et al. Prognostic Implications of Multiplex Detection of KRAS Mutations in Cell-Free DNA from Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Chem.* 1 de abril de 2018;64(4):726-34.
118. Cheng H, Liu C, Jiang J, Luo G, Lu Y, Jin K, et al. Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients: Clinical value of ctDNA in metastatic pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 15 de mayo de 2017;140(10):2344-50.
119. Sugimori M, Sugimori K, Tsuchiya H, Suzuki Y, Tsuyuki S, Kaneta Y, et al. Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy. *Cancer Sci.* enero de 2020;111(1):266-78.
120. Kruger S, Heinemann V, Ross C, Diehl F, Nagel D, Ormanns S, et al. Repeated mutKRAS ctDNA measurements represent a novel and promising tool for early response prediction and therapy monitoring in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol.* diciembre de 2018;29(12):2348-55.
121. Wei T, Zhang Q, Li X, Su W, Li G, Ma T, et al. Monitoring Tumor Burden in Response to FOLFIRINOX Chemotherapy Via Profiling Circulating Cell-Free DNA in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther.* enero de 2019;18(1):196-203.
122. Perets R, Greenberg O, Shentzer T, Semenisty V, Epelbaum R, Bick T, et al. Mutant KRAS Circulating Tumor DNA Is an Accurate Tool for Pancreatic Cancer Monitoring. *The Oncologist.* mayo de 2018;23(5):566-72.

123. Bachet JB, Blons H, Hammel P, Hariry IE, Portales F, Mineur L, et al. Circulating Tumor DNA is Prognostic and Potentially Predictive of Eryaspase Efficacy in Second-line in Patients with Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 de octubre de 2020;26(19):5208-16.
124. Berger AW, Schwerdel D, Ettrich TJ, Hann A, Schmidt SA, Kleger A, et al. Targeted deep sequencing of circulating tumor DNA in metastatic pancreatic cancer. *Oncotarget.* 5 de enero de 2018;9(2):2076-85.
125. Park G, Park JK, Son DS, Shin SH, Kim YJ, Jeon HJ, et al. Utility of targeted deep sequencing for detecting circulating tumor DNA in pancreatic cancer patients. *Sci Rep.* diciembre de 2018;8(1):11631.
126. Del Re M, Vivaldi C, Rofi E, Vasile E, Miccoli M, Caparello C, et al. Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci Rep.* diciembre de 2017;7(1):7931.
127. Chantrill LA, Nagrial AM, Watson C, Johns AL, Martyn-Smith M, Simpson S, et al. Precision Medicine for Advanced Pancreas Cancer: The Individualized Molecular Pancreatic Cancer Therapy (IMPACT) Trial. *Clin Cancer Res.* 1 de mayo de 2015;21(9):2029-37.
128. Pishvaian MJ, Bender RJ, Halverson D, Rahib L, Hendifar AE, Mikhail S, et al. Molecular Profiling of Patients with Pancreatic Cancer: Initial Results from the Know Your Tumor Initiative. *Clin Cancer Res.* 15 de octubre de 2018;24(20):5018-27.
129. Hu ZI, Shia J, Stadler ZK, Varghese AM, Capanu M, Salo-Mullen E, et al. Evaluating Mismatch Repair Deficiency in Pancreatic Adenocarcinoma: Challenges and Recommendations. *Clin Cancer Res.* 15 de marzo de 2018;24(6):1326-36.
130. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair–Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol.* 1 de enero de 2020;38(1):1-10.
131. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *Lancet Oncol.* febrero de 2020;21(2):271-82.
132. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion–Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 22 de febrero de 2018;378(8):731-9.
133. Schram AM, O'Reilly EM, Somwar R, Benayed R, Shameem S, Chauhan T, et al. Abstract PR02: Clinical proof of concept for MCLA-128, a bispecific HER2/3 antibody therapy, in NRG1 fusion-positive cancers. En: *Monoclonal Antibodies [Internet]. American Association for Cancer Research; 2019 [citado 27 de marzo de 2022].* p. PR02-PR02. Disponible en: <http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.TARG-19-PR02>
134. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, Desai J, Durm GA, Shapiro GI, et al. KRAS G12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med.* 24 de septiembre de 2020;383(13):1207-17.
135. Mao Z, Xiao H, Shen P, Yang Y, Xue J, Yang Y, et al. KRAS(G12D) can be targeted by potent inhibitors via formation of salt bridge. *Cell Discov.* 25 de enero de 2022;8(1):5.
136. Wei D, Wang L, Zuo X, Maitra A, Bresalier RS. A Small Molecule with Big Impact: MRTX1133 Targets the KRASG12D Mutation in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 9 de noviembre de 2023;OF1-8.
137. Mahadevan KK, McAndrews KM, LeBleu VS, Yang S, Lyu H, Li B, et al. KRASG12D inhibition reprograms the microenvironment of early and advanced pancreatic cancer to promote FAS-mediated killing by CD8+ T cells. *Cancer Cell.* septiembre de 2023;41(9):1606-1620.e8.
138. Zill OA, Greene C, Sebisanoovic D, Siew LM, Leng J, Vu M, et al. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov.* octubre de 2015;5(10):1040-8.
139. Luchini C, Veronese N, Nottegar A, Cappelletti V, Daidone MG, Smith L, et al. Liquid Biopsy as Surrogate for Tissue for Molecular Profiling in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis Towards Precision Medicine. *Cancers.* 10 de agosto de 2019;11(8):1152.

140. Vietsch EE, Graham GT, McCutcheon JN, Javaid A, Giaccone G, Marshall JL, et al. Circulating cell-free DNA mutation patterns in early and late stage colon and pancreatic cancer. *Cancer Genet.* diciembre de 2017;218-219:39-50.
141. Makohon-Moore AP, Zhang M, Reiter JG, Bozic I, Allen B, Kundu D, et al. Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer. *Nat Genet.* marzo de 2017;49(3):358-66.
142. Pishvaian MJ, Bender RJ, Matrisian LM, Rahib L, Hendifar A, Hoos WA, et al. A pilot study evaluating concordance between blood-based and patient-matched tumor molecular testing within pancreatic cancer patients participating in the Know Your Tumor (KYT) initiative. *Oncotarget.* 13 de octubre de 2017;8(48):83446-56.
143. Patel H, Okamura R, Fanta P, Patel C, Lanman RB, Raymond VM, et al. Clinical correlates of blood-derived circulating tumor DNA in pancreatic cancer. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* diciembre de 2019;12(1):130.
144. Takai E, Totoki Y, Nakamura H, Morizane C, Nara S, Hama N, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep.* diciembre de 2015;5(1):18425.
145. Botrus G, Kosirorek H, Sonbol MB, Kusne Y, Uson Junior PLS, Borad MJ, et al. Circulating Tumor DNA -Based Testing and Actionable Findings in Patients with Advanced and Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *The Oncologist.* julio de 2021;26(7):569-78.
146. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, et al. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas.* mayo de 2010;39(4):425-35.
147. Jin MZ, Han RR, Qiu GZ, Ju XC, Lou G, Jin WL. Organoids: An intermediate modeling platform in precision oncology. *Cancer Lett.* febrero de 2018;414:174-80.
148. Lancaster MA, Huch M. Disease modelling in human organoids. *Dis Model Mech.* 1 de julio de 2019;12(7):dmm039347.
149. Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc.* septiembre de 2016;11(9):1724-43.
150. Bertaux-Skeirik N, Centeno J, Feng R, Schumacher MA, Shivdasani RA, Zavros Y. Co-culture of Gastric Organoids and Immortalized Stomach Mesenchymal Cells. En: Ivanov AI, editor. *Gastrointestinal Physiology and Diseases [Internet].* New York, NY: Springer New York; 2016 [citado 2 de abril de 2022]. p. 23-31. (Methods in Molecular Biology; vol. 1422). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3603-8_3
151. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell.* septiembre de 2018;174(6):1586-1598.e12.
152. Tsai S, McOlash L, Palen K, Johnson B, Duris C, Yang Q, et al. Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Cancer.* diciembre de 2018;18(1):335.
153. Jiang B, Zhou L, Lu J, Wang Y, Liu C, You L, et al. Stroma-Targeting Therapy in Pancreatic Cancer: One Coin With Two Sides? *Front Oncol.* 15 de octubre de 2020;10:576399.
154. Kuen J, Darowski D, Kluge T, Majety M. Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. Ahmad A, editor. *PLOS ONE.* 27 de julio de 2017;12(7):e0182039.
155. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, et al. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell.* enero de 2015;160(1-2):324-38.
156. Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med.* noviembre de 2015;21(11):1364-71.
157. Romero-Calvo I, Weber CR, Ray M, Brown M, Kirby K, Nandi RK, et al. Human Organoids Share Structural and Genetic Features with Primary Pancreatic Adenocarcinoma Tumors. *Mol Cancer Res.* enero de 2019;17(1):70-83.

158. Lee J, Snyder ER, Liu Y, Gu X, Wang J, Flowers BM, et al. Reconstituting development of pancreatic intraepithelial neoplasia from primary human pancreas duct cells. *Nat Commun.* abril de 2017;8(1):14686.
159. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 6 de marzo de 2017;214(3):579-96.
160. Holokai L, Chakrabarti J, Lundy J, Croagh D, Adhikary P, Richards SS, et al. Murine- and Human-Derived Autologous Organoid/Immune Cell Co-Cultures as Pre-Clinical Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers.* 17 de diciembre de 2020;12(12):3816.
161. Tiriác H, Belleau P, Engle DD, Plenker D, Deschênes A, Somerville TDD, et al. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* septiembre de 2018;8(9):1112-29.
162. Tiriác H, Bucobo JC, Tzimas D, Grewel S, Lacombe JF, Rowehl LM, et al. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment. *Gastrointest Endosc.* junio de 2018;87(6):1474-80.
163. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquina PJ, Karthaus WR, Gopalan A, et al. Organoid Cultures Derived from Patients with Advanced Prostate Cancer. *Cell.* septiembre de 2014;159(1):176-87.
164. Zhang Z, Shiratsuchi H, Lin J, Chen G, Reddy RM, Azizi E, et al. Expansion of CTCs from early stage lung cancer patients using a microfluidic co-culture model. *Oncotarget.* 15 de diciembre de 2014;5(23):12383-97.
165. Arnoletti JP, Fanaian N, Reza J, Sause R, Almodovar AJ, Srivastava M, et al. Pancreatic and bile duct cancer circulating tumor cells (CTC) form immune-resistant multi-cell type clusters in the portal venous circulation. *Cancer Biol Ther.* 3 de octubre de 2018;19(10):887-97.
166. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, et al. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell.* marzo de 2018;22(3):454-467.e6.
167. Gendoo DMA, Denroche RE, Zhang A, Radulovich N, Jang GH, Lemire M, et al. Whole genomes define concordance of matched primary, xenograft, and organoid models of pancreas cancer. Tanay A, editor. *PLOS Comput Biol.* 10 de enero de 2019;15(1):e1006596.
168. Dougan SK. The Pancreatic Cancer Microenvironment. *Cancer J.* noviembre de 2017;23(6):321-5.
169. Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, et al. Basement membrane destruction by pancreatic stellate cells leads to local invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* julio de 2018;425:65-77.
170. Kaneta Y, Sato T, Hikiba Y, Sugimori M, Sue S, Kaneko H, et al. Loss of Pancreatic E-Cadherin Causes Pancreatitis-Like Changes and Contributes to Carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020;9(1):105-19.
171. Huang W, Navarro-Serer B, Jeong YJ, Chianchiano P, Xia L, Luchini C, et al. Pattern of Invasion in Human Pancreatic Cancer Organoids Is Associated with Loss of SMAD4 and Clinical Outcome. *Cancer Res.* 1 de julio de 2020;80(13):2804-17.
172. Su J, Morgani SM, David CJ, Wang Q, Er EE, Huang YH, et al. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1. *Nature.* 23 de enero de 2020;577(7791):566-71.
173. Aung KL, Fischer SE, Denroche RE, Jang GH, Dodd A, Creighton S, et al. Genomics-Driven Precision Medicine for Advanced Pancreatic Cancer: Early Results from the COMPASS Trial. *Clin Cancer Res.* 15 de marzo de 2018;24(6):1344-54.
174. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science.* 23 de febrero de 2018;359(6378):920-6.
175. Driehuis E, van Hoeck A, Moore K, Kolders S, Francies HE, Gulersonmez MC, et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening. *Proc Natl Acad Sci.* 26 de diciembre de 2019;116(52):26580-90.

176. Sharick JT, Walsh CM, Sprackling CM, Pasch CA, Pham DL, Esbona K, et al. Metabolic Heterogeneity in Patient Tumor-Derived Organoids by Primary Site and Drug Treatment. *Front Oncol.* 15 de mayo de 2020;10:553.
177. Grossman JE, Muthuswamy L, Huang L, Akshinthala D, Perea S, Gonzalez RS, et al. Organoid Sensitivity Correlates with Therapeutic Response in Patients with Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res.* 15 de febrero de 2022;28(4):708-18.
178. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci.* 25 de octubre de 2005;102(43):15545-50.
179. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995;57(1):289-300.
180. Akaike H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. En: 2nd International Symposium on Information Theory. BN Petrov; F Csaki. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiadó; 1973. p. 267-81.
181. {R: A Language and Environment for Statistical Computing} [Internet]. {{R Core Team}}; 2023. Disponible en: {<https://www.R-project.org/>}
182. maxstat: Maximally Selected Rank Statistics version 0.7-25 from CRAN [Internet]. [citado 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://rdrr.io/cran/maxstat/>
183. Therneau T. A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.2-13. 2021. 2021.
184. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P, Fabian S. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4. 9. 2021. 2021.
185. Kratz CP, Achatz MI, Brugières L, Frebourg T, Garber JE, Greer MLC, et al. Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome. *Clin Cancer Res.* 31 de mayo de 2017;23(11):e38-45.
186. Martin-Giacalone BA, Rideau TT, Scheurer ME, Lupo PJ, Wang LL. Cancer risk among RECQL4 heterozygotes. *Cancer Genet.* abril de 2022;262-263:107-10.
187. Peng Y, Xu Y, Zhang X, Deng S, Yuan Y, Luo X, et al. A novel protein AXIN1-295aa encoded by circAXIN1 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote gastric cancer progression. *Mol Cancer.* 4 de diciembre de 2021;20(1):158.
188. Zhang Y, Wang Y, Huang X, Li Q, Li K, You D, et al. Association between AXIN1 gene polymorphisms and epithelial ovarian cancer in Chinese population. *Biomark Med.* abril de 2019;13(6):445-55.
189. Fakhri MG, Salvatore L, Esaki T, Modest DP, Lopez-Bravo DP, Taieb J, et al. Sotorasib plus Panitumumab in Refractory Colorectal Cancer with Mutated KRAS G12C. *N Engl J Med.* 22 de octubre de 2023;NEJMoa2308795.
190. Strickler JH, Satake H, George TJ, Yaeger R, Hollebecque A, Garrido-Laguna I, et al. Sotorasib in KRAS p.G12C–Mutated Advanced Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 5 de enero de 2023;388(1):33-43.
191. Bekaii-Saab TS, Yaeger R, Spira AI, Pelster MS, Sabari JK, Hafez N, et al. Adagrasib in Advanced Solid Tumors Harboring a KRAS G12C Mutation. *J Clin Oncol.* 1 de septiembre de 2023;41(25):4097-106.
192. Yaeger R, Weiss J, Pelster MS, Spira AI, Barve M, Ou SHI, et al. Adagrasib with or without Cetuximab in Colorectal Cancer with Mutated KRAS G12C. *N Engl J Med.* 5 de enero de 2023;388(1):44-54.
193. Gulay KCM, Zhang X, Pantazopoulou V, Patel J, Esparza E, Pran Babu DS, et al. Dual Inhibition of KRASG12D and Pan-ERBB Is Synergistic in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 15 de septiembre de 2023;83(18):3001-12.
194. Connor AA, Gallinger S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. *Nat Rev Cancer.* marzo de 2022;22(3):131-42.
195. Pascual J, Attard G, Bidard FC, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* agosto de 2022;33(8):750-68.

196. Luan H, He Y, Zhang T, Su Y, Zhou L. The identification of liver metastasis- and prognosis-associated genes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 27 de abril de 2022;22(1):463.
197. Decoster C, Gilabert M, Autret A, Turrini O, Oziel-Taieb S, Poizat F, et al. Heterogeneity of metastatic pancreatic adenocarcinoma: Lung metastasis show better prognosis than liver metastasis-a case control study. *Oncotarget*. 19 de julio de 2016;7(29):45649-55.
198. Botrus G, Uson Junior PLS, Raman P, Kaufman AE, Kosiorek H, Yin J, et al. Circulating Cell-Free Tumor DNA in Advanced Pancreatic Adenocarcinoma Identifies Patients With Worse Overall Survival. *Front Oncol*. 10 de enero de 2022;11:794009.
199. Umemoto K, Sunakawa Y, Ueno M, Furukawa M, Mizuno N, Sudo K, et al. Clinical significance of circulating-tumour DNA analysis by metastatic sites in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 12 de abril de 2023;128(8):1603-8.
200. Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, Morimoto Y, Dohi C, Tsutsumi K, et al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: K-ras in Blood With Pancreatic Cancer. *Cancer*. 1 de julio de 2015;121(13):2271-80.
201. Parikh AR, Mojtahed A, Schneider JL, Kanter K, Van Seventer EE, Fetter IJ, et al. Serial ctDNA Monitoring to Predict Response to Systemic Therapy in Metastatic Gastrointestinal Cancers. *Clin Cancer Res*. 15 de abril de 2020;26(8):1877-85.
202. Yao J, Yang M, Atteh L, Liu P, Mao Y, Meng W, et al. A pancreas tumor derived organoid study: from drug screen to precision medicine. *Cancer Cell Int*. diciembre de 2021;21(1):398.
203. Le Compte M, De La Hoz EC, Peeters S, Fortes FR, Hermans C, Domen A, et al. Single-organoid analysis reveals clinically relevant treatment-resistant and invasive subclones in pancreatic cancer. *Npj Precis Oncol*. 8 de diciembre de 2023;7(1):128.
204. Gong M, Meng H, Tan D, Li P, Qin J, An Q, et al. Establishment of organoid models for pancreatic ductal adenocarcinoma and screening of individualized therapy strategy. *Anim Models Exp Med*. octubre de 2023;6(5):409-18.
205. Papaccio F, García-Mico B, Gimeno-Valiente F, Cabeza-Segura M, Gambardella V, Gutiérrez-Bravo MF, et al. "Proteotranscriptomic analysis of advanced colorectal cancer patient derived organoids for drug sensitivity prediction". *J Exp Clin Cancer Res*. 6 de enero de 2023;42(1):8.
206. Díaz-Alejo JF, April-Monn S, Cihova M, Buocikova V, Villalón López J, Urbanova M, et al. Establishment of Pancreatic Cancer-Derived Tumor Organoids and Fibroblasts From Fresh Tissue. *J Vis Exp*. 26 de mayo de 2023;(195):65229.
207. Blumenschein GR, Smit EF, Planchard D, Kim DW, Cadrel J, De Pas T, et al. A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*. mayo de 2015;26(5):894-901.
208. Infante JR, Somer BG, Park JO, Li CP, Scheulen ME, Kasubhai SM, et al. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer*. agosto de 2014;50(12):2072-81.
209. Williamson CT, Miller R, Pemberton HN, Jones SE, Campbell J, Konde A, et al. ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A. *Nat Commun*. 13 de diciembre de 2016;7(1):13837.

ABREVIATURAS

AAGAB: Alpha And Gamma Adaptin Binding protein
ACVR2A: ACtiVin A Receptor type 2A
ACVR1B: ACtiVin A Receptor type 1B
ADEX: Aberrantemente Diferenciado Endocrino eXocrino
ADN/DNA: Ácido DesoxirriboNucleico/ DeoxyriboNucleid Acid
ADNg/gDNA: Ácido DesoxirriboNucleico germinal/ germinal DeoxyriboNucleid Acid
AKT: AKT serine/threonine kinase
AL: Lysis buffer (tampón de lisis)
ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase
APC: Adenomatous Polyposis Coli (poliposis adenomatosa de colon)
APIs: Application Programming Interfaces (interfaces de programación de aplicaciones)
ARID1A: AT-Rich Interactive Domain-containing protein 1A
ARN/RNA: Ácido RiboNucleico/ RiboNucleid Acid
ATL: Tissue Lysis Buffer (tampón de lisis de tejido)
ATM: Gen Ataxia Telangiectasia Mutado
AXL: AXL receptor tyrosine kinase
BARD1: BRCA1 associated RING domain 1
BEAMing: Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics
BME: Basement Membrane Extract (Extracto de Membrana Basal)
BMPRIA: Bone Morphogenetic Protein Receptor type 1A
BPER: Base-Position Error Rate
BRAF: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRCA: BReast CAncer (Gen del cáncer de mama)
CAF(s): Cancer-Associated Fibroblast (s) (fibroblasto (s) asociado (s) a tumor)
CA 19.9: Carbohydrate Antigen 19.9 (antígeno carbohidrato 19.9)
CCDN2: G1/S-specific cyclin-D2
CDC73: Cell Division Cycle 73
CDK: Cyclin-Dependent Kinases
CDKN2A: Cyclin-Dependent KiNase inhibitor 2A
CEA: CarcinoEmbryonary Antigen (antígeno carcinoembrionario)
cfDNA: cell free DNA (ADN libre celular)
CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHECK2: CHECKpoint kinase 2
CI: Confidence Interval (intervalo de confianza)
CNV: Copy Number Variation (variaciones de número de copias)
COL14A1: COLlagen type XIV Alpha 1 chain
CTC(s): Célula(s) Tumoral(es) Ciruculante(s)

CTRCK: ChymoTRypsin C
 cfDNA: cell free DNA (AND libre circulante)
 ctDNA: circulating tumor DNA (ADN circulante tumoral)
CTNNB1: CaTeNiN Beta 1
 dPCR: digital Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa digital)
 ddPCR: droplet digital Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa digital de gotas)
 dMMR: MisMatch Repair deficient
 dsDNA: double-stranded DNA (ADN de doble cadena)
 ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group
 EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid (Ácido EtilenoDiaminaTetraacético)
EGFR: Epithelial Grow Factor Receptor
EPCAM: EPithelial Cell Adhesion Molecule
ERBB2: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ERCC2: ERCC excision repair 2, TFIIH core complex helicase subunit
 EMR: Enfermedad Mínima Residual
 EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition (transición epitelio mesénquima)
EPHA7: EPH receptor A7
EZH2K: Enhancer of Zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FANCD2: Fanconi ANemia Complementation group D2
FANCL: Fanconi ANemia Complementation group L
FANI: FANCD2 and FANCI Associated Nuclease 1
FAP: Familiar Adenomatous Polyposis (polipomatosis adenomatosa familiar)
 FDR: False Discovery Rate (tasa de descubrimiento falso)
 FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (tejidos fijados en formalina, embebidos en parafina)
FGFR: Fibroblast Grow Factor Receptor
FLT-3: Fms Like Tyrosine kinase 3
 FOLFIRINOX: Ácido FOLínico+Fluorouracilo+IRINotecan+Oxaliplatino.
 FOLFOX: Ácido FOLínico+Fluorouracilo +Oxaliplatino.
 FU: FluoroUracilo
 GA: Gemcitabina+Nab-paclitaxel
GATA6: GATA binding protein 6
 GC: Gemcitabina+Capecitabina
 gDNA: Germinal DNA (ADN germinal)
 GH: Grado Histológico
GNAS: Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Stimulating
 GTP: Guanosine TriPhosphate (Guanosin Trifosfato)
 HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia
 HGF: Hepatocyte Grow Factor (factor de crecimiento hepatocitario)

HGVSp: Human Genome Variation Society description at protein level
HR: Hazard Ratio
HRD: Homologous Recombination Deficiency (deficiencia de recombinación homóloga)
JNK: c-Jun N-terminal kinase
KDM6A: Lysine Demethylase 6A
KIT: KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KMT2C: lysine methyltransferase 2C. Conocido también como MLL3
KRAS: Kirsten RAt Sarcoma virus
KYT: Know Your Tumor
LKB1: Liver Kinase B1. Conocido también como STK11
LA: Localmente Avanzado
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MAP3K21: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 21
Mb: Megabase
MB: Medio Basal
MCN: Mucinous Cystic Neoplasm (neoplasia mucinosa quística)
MET: MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
ml: mililitros
MLH1: MutL Homolog 1; Colon Cancer, nonpolyposic type 2
MLH3: MutL Homolog 3
MMRD: MisMatch Repair Deficiency
MPPG: Most Prevalent Pancreatic cancer Genes (genes más frecuentes en cáncer de páncreas)
MSH2: MutS Homolog 2
MSH6: MutS homolog 6
MSI-H: MicroSatellite Instability High
mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
MYC: MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
NA: No Alcanzada
NCCN: National Comprehensive Cancer Network
(Neo)ady.: (Neo)adyuvancia
NF1: NeuroFibromin 1
NGS: Next Generation Sequencing (secuenciación de nueva generación)
NOTCH1: Neurogenic locus notch homolog protein 1
NRAS: Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NRG1: NeuReGulin 1
NTHL1: NTH Like DNA glycosylase 1
NTRK: Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor
OR: Odds Ratio
PALB2: PArtner and Localizer of BRCA2

PALLD: PALLaDin, cytoskeletal associated protein
 PanIN(s): Pancreatic Intraepithelial Neoplasia(s) (neoplasia(s) intraepitelial(es) pancreática(s))
 PARP: Poly (ADP-Ribose) Polymerases
 pb: par de bases
PBRM1: PolyBRoMo 1
 PBS: Phosphate Buffered Saline (solución salina amortiguada por fosfatos)
 PCR: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
 PDAC: Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma (adenocarcinoma ductal pancreático)
PDGFRA: Platelet-Derived Growth Factor Receptor A
 PDO(s): Patient Derived Organoid(s) (Organoide(s) Derivado(s) de Paciente(s))
PDX1: Pancreatic and Duodenal homeoboX 1
 PD-1: Programed Death-1
 PD-L1: Programed Death Ligand-1
 PFA: Paraformaldehyde (paraformaldehido)
PMS2: PMS1 homolog 2
 PNO: Pancreatic Normal Organoid (Organoide Pancreático Normal)
PRSSI: Serine Protease 1
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
 PTO(s): Pancreatic Tumor Organoid(s) (Organoide(s) Pancreático(s) Tumoral(es))
 PTT(s): Tejido(s) Tumoral(es) Parafinado(s)
 qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
 QRT: Quimio-RadioTerapia
 QT: QuimioTerapia
RABL3: RAB, member of RAS oncogene family Like 3
RAD51C: RAD51 homolog C
RECQL4: RecQ like helicase 4
 Resec: Resección
RET: ret proto-oncogene
RNF43: Ring Finger Protein 43
RPS20: Ribosomal Protein S20
SEMA4A: SEMAphorin 4A
 Sd: syndrome
SF3B1: Splicing Factor 3b subunit 1
 SG: Supervivencia Global
 Sgto: Seguimiento
 SLP: Supervivencia Libre de Progresión
 SLR: Supervivencia Libre de Recaída
SMAD4: Small Mothers Against Decantaplegic 4
SMARCA4: SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 4

SNV: Single Nucleotide Variant (variaciones de nucleótido único)
SPINK1: Serine Peptidase Inhibitor Kazal type 1
STK11: Serine/Threonine Kinase 11. Conocido también como LKB1
TAC: Tomografía Axial Computarizada
TCGA: The Cancer Genomic Atlas
tDNA: tissue or tumor DNA (ADN tumoral o de tejido)
TGF β : Transforming Growth Factor Beta
TGFBR2: Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
TNM: Tumor Node Metastasis
TPMI: Tumor Papilar Mucinoso Intraductal
TP53: Tumoral Protein 53
TP63: Tumoral Protein 63
TSC2: Tuberous Sclerosis Complex 2
UMI: Unique Molecular Identifier (Identificadores de Molécula Única)
VAF: Variant Allele Frequency (fracción alélica mutada)
Viab.: Viabilidad
WBC(s): White Blood Cell(s) (célula(s) mononucleada(s) de sangre periférica)
WES: Whole Exome Sequencing (secuenciación del exoma completo)
WNT1: Wnt family member 1
ZNF: ZiNc Finger
ZRSR2: zinc finger CCCH-type, RNA binding motif and serine/arginine rich 2

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los síndromes de cáncer de páncreas hereditario.

Tabla 2. Subtipos transcripcionales de las distintas clasificaciones de adenocarcinoma de páncreas más reconocidas.

Tabla 3. Comparativa de ventajas y desventajas de las técnicas de análisis de ctDNA

Tabla 4. Modelos *in vitro* más utilizados en la actualidad con sus principales ventajas y desventajas con respecto al resto.

Tabla 5. Principales características de los pacientes de la serie (todos los estadios).

Tabla 6. Características de los pacientes estadio IV de la cohorte seleccionada para la secuenciación (cohorte de descubrimiento).

Tabla 7. Características de los pacientes estadio IV de la cohorte validación interna de los resultados de ddPCR en la cohorte de descubrimiento.

Tabla 8. Genes pertenecientes a la HALLMARK de cáncer de páncreas.

Tabla 9. Mutaciones germinales potencialmente patogénicas.

Tabla 10. Mutaciones detectadas en tejido tumoral con potencial accionabilidad según OncoKB.

Tabla 11. Mutaciones potencialmente accionables detectadas en las muestras de plasma.

Tabla 12. Estado de la mutación de *KRAS* en muestras de plasma antes de iniciar tratamiento (basal) y en el momento de primera valoración de respuesta (1ª evaluación) en la cohorte de descubrimiento y de validación.

Tabla 13. Regresión de COX univariante y multivariante en la cohorte de validación.

Tabla 14. Características clínico-patológicas de los casos recogidos para la generación de organoides.

Tabla 15. Resumen de las mutaciones potencialmente accionables según oncoKB detectadas en los casos con PTOs estudiados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapas representativos de las tasas de incidencia (A) y mortalidad (B) del cáncer de páncreas estimados en ambos sexos en 2020 según GLOBOCAN (ajustadas por edad según población estándar mundial, por 100 000 habitantes).

Figura 2. Subgrupos de pacientes incluidos en el estudio y esquema de su manejo clínico según resecabilidad.

Figura 3. Esquema de recogida de muestras de tejido y plasma.

Figura 4. Esquema de los grupos y cohortes del proyecto y pacientes analizados.

Figura 5. Análisis de ddPCR mediante el software de análisis QuantaSoft de Bio-Rad.

Figura 6. Diagrama de flujo de pacientes intervenidos.

Figura 7. Gráficos de evaluación y control de calidad de las muestras ctDNA tras su análisis mediante TapeStation.

Figura 8. Esquema de selección de muestras de tejido parafinado para el análisis de resultados de secuenciación.

Figura 9. Gráficas representativas de la calidad de las muestras de parafina.

Figura 10. Gráfico de las SNVs detectadas en las muestras de tumor parafinadas.

Figura 11. Gráfico de las variaciones de número de copias (CNV) patogénicas o potencialmente patogénicas en los genes de la hallmark de páncreas de las muestras de tejido.

Figura 12. Representación de las SNVs detectadas en las muestras de plasma.

Figura 13. Gráfico volcán representativo de los genes diferencialmente mutados al diagnóstico en pacientes de menor supervivencia.

Figura 14. Gráfico volcán representativo de los genes diferencialmente mutados al diagnóstico en pacientes con metástasis hepáticas al diagnóstico.

Figura 15. Gráfico que representa las CNV en genes de la hallmark de páncreas detectadas en las muestras de plasma.

Figura 16. Diagrama de flujo representativo de las muestras disponibles de los pacientes de la cohorte de descubrimiento para el estudio óptimo mediante WES.

Figura 17. Panorama mutacional de las alteraciones detectadas en las muestras pareadas.

Figura 18. Concordancia de mutaciones de muestras pareadas de tejido y plasma.

Figura 19. Gráfico tipo “swimmer plot” representativo de la evolución en el tiempo de los pacientes de la cohorte de descubrimiento y el estatus de la mutación de *KRAS* analizado por ddPCR durante la evolución.

Figura 20. Representación de la SLP de pacientes con mutación detectable de *KRAS* por ddPCR (positivos) frente a los que no se detecta (negativos) en la cohorte de descubrimiento.

Figura 21. Representación de la SLP y SG de pacientes con mutación detectable de *KRAS* por ddPCR (positivos) frente a los que no se detecta (negativos) en la cohorte de validación.

Figura 22. Análisis de Kaplan-Meier de todos los pacientes según la evolución del status de *KRAS* durante tratamiento de primera línea.

Figura 23. Curva Kaplan-Meier de SLP de los pacientes de “alto riesgo” (con reducción de VAF $\leq 84.74\%$) frente a “bajo riesgo (reducción $> 84.75\%$) en la cohorte de descubrimiento.

Figura 24. Curva Kaplan-Meier de SLP de los pacientes de “alto riesgo” (reducción de VAF $\leq 84.74\%$) frente a los de “bajo riesgo” (reducción $> 84.75\%$) en la cohorte de validación.

Figura 25. Gráfico circular representativo de la tasa de éxito en la generación de PDOs pancreáticos.

Figura 26. Imágenes del cultivo de los PTOs establecidos al microscopio en campo claro.

Figura 27. Gráfico representativo de las mutaciones (SNVs) patogénicas detectadas mediante WES en los organoides tumorales y/o en sus correspondientes tejidos parafinados archivados.

Figura 28. Gráfico representativo de las mutaciones (SNVs) oncogénicas potencialmente accionables según OncoKB en PTOs y/o PTTs.

Figura 29. Ensayo de viabilidad celular frente a control sin tratamiento en organoide PTO9 tras la exposición a concentraciones crecientes de distintas quimioterapias citotóxicas.

Figura 30. Ensayo de viabilidad celular frente a control sin tratamiento en organoide PTO9 tras la exposición a concentraciones crecientes de diferentes fármacos dirigidos.

Figura 31. Ensayo de viabilidad celular frente a control sin tratamiento en organoide PTO16 tras la exposición a concentraciones crecientes de quimioterapias citotóxicas.

Figura 32. Ensayo de viabilidad celular frente a control sin tratamiento en organoide PTO16 tras la exposición a concentraciones crecientes de distintos fármacos dirigidos.

Figura 33. Heatmap representativo de las distintas sensibilidades farmacológicas de los organoides.

