

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



**POLIMORFISMOS GENÉTICOS RELACIONADOS CON
AUTOFAGIA Y SU IMPACTO EN EL DIAGNÓSTICO,
PRONÓSTICO Y SUPERVIVENCIA EN PACIENTES
AFECTOS DE ADENOCARCINOMA DUCTAL DE
PÁNCREAS**

Tesis para optar al grado de doctor:

Fernando Gálvez Montosa

Directores de la tesis:

Juan Sainz Pérez

Pedro Sánchez Rovira

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Fernando Gálvez Montosa
ISBN: 978-84-1195-718-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/102631>

Dedicado a todos aquellos que han labrado mi camino

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por ser mi refugio, mi ejemplo, mi motor.

A mi padre, que allí donde esté, siempre será mi referente.

A mi hermano, mi mejor amigo y compañero. Nunca nadie cubrirá mejor ese hueco.

Al servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de Jaén, mi familia científica. Por hacer que ir a trabajar sea un gusto.

A Javi y Juande. Por descubrir el mundo juntos todos los días.

A Jose Miguel, Paco, Marta, María Jesús, Javier y Nadia. Mis mentores. Ojalá ser como ellos algún día

A Ana, Marisol y Carlos. Por ser las raíces en los mejores y peores momentos.

A mis residentes, por permitirme ser docente y a la vez, aprender todos los días.

A Natalia y Miguel, por ser un apoyo constante y hacer que mi luz tenga foco.

A Fran, por compartir el proceso de hacer una tesis.

A Ana Laura, de la que tanto he aprendido y seguiré aprendiendo.

A Jose y a Alberto, porque para que la mente funcione, necesita un cuerpo fuerte. Fuisteis los impulsores del cambio que necesitaba.

A José Manuel, Paco, Verónica, Breo, Fran y demás amigos de la industria farmacéutica. Por todas las oportunidades de crecimiento que siempre me han dado

A mis directores, Pedro y Juan. Por ser el ejemplo de excelencia al que aspirar.

A todos mis pacientes, por haberme permitido tener experiencia científica y vivencias humanas que me han hecho ser el médico que soy.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	6
ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1 CÁNCER DE PÁNCREAS.....	18
1.2 EPIDEMIOLOGÍA	18
1.3 CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA	22
1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO	25
1.5 ESTADIFICACIÓN.....	28
1.6 TRATAMIENTO ENFERMEDAD LOCALIZADA	30
1.7 TRATAMIENTO ENFERMEDAD METASTÁSICA.....	35
1.8 GENÉTICA DEL CÁNCER DE PÁNCREAS.....	39
1.9 LA VÍA DE LA AUTOFAGIA.....	49
1.9.1 EL PROCESO DE LA AUTOFAGIA	49
1.9.2 AUTOFAGIA Y CÁNCER	54
1.9.3 AUTOFAGIA Y CÁNCER DE PÁNCREAS.....	57
1.9.4 .AUTOFAGIA COMO DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE PÁNCREAS.....	59
2. JUSTIFICACIÓN.....	64
3. OBJETIVOS	67

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
4.1 Selección de pacientes	69
4.2 Elección de los SNPs y metaanálisis de cohortes	69
4.3 Cohortes de replicación, genotipado y metaanálisis.....	70
4.4 Efecto funcional de las variantes relacionadas con la autofagia.....	73
4.5 Correlación de los SNPs identificados con los recuentos de células sanguíneas y los perfiles proteómicos séricos/plasmáticos.....	74
4.6 Correlación entre los SNPs identificados y las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroideas.....	75
4.7 Análisis funcionales in silico	76
5. RESULTADOS.....	79
6. DISCUSIÓN	85
7. CONCLUSIONES	93
8. ARTÍCULO.....	95
9. BIBLIOGRAFÍA	110
10. ANEXOS.....	127

ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracilo

ADP: Adenocarcinoma de páncreas

ATG: Abreviatura del inglés *Autophagy related genes*

CAF: Fibroblastos asociados al cáncer

CMA: Abreviatura del inglés *Chaperone-mediated autophagy*

CP: Cáncer de páncreas

cQTL: Abreviatura del inglés *cytokine Quantitative trait loci*

FOLFIRINOX: 5-Fluorouracilo + Leucovorin + Irinotecan + Oxaliplatino

HR: Hazard ratio

IMC: Índice de masa corporal

LC3/MAP1BLC3: Abreviatura del inglés *Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha*

MAF: Abreviatura del inglés *Minor allele frequency*

MDMs: macrófagos derivados de monocitos

MUC1: Mucin 1

MUC2: Mucin 2

NIH-AARP: Abreviatura del inglés *National Institute of Health- American Association of Retired Persons*

PanIN: Neoplasias intraepiteliales de alto grado

PBMCs: Abreviatura del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PC: Abreviatura del inglés *Pancreatic cancer*

PDAC: Abreviatura del inglés *Pancreatic ductal adenocarcinoma*

PI3P: Fosfatidil inositol 3-fosfato

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SG: Supervivencia global

SLP: Supervivencia libre de progresión

SNARE: Abreviatura del inglés *SNAP receptors*

TAC: Tomografía axial computerizada

RESUMEN

El cáncer de páncreas (CP) es una enfermedad devastadora. La neoplasia maligna más común en el páncreas es el adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) que se origina en el epitelio que recubre los ductos pancreáticos encargados del transporte de los jugos pancreáticos hacia el intestino para la digestión de los alimentos. El ADP engloba al 85-90% de las neoplasias malignas del páncreas por lo que es común que en la literatura se utilice el término general de “cáncer de páncreas” como sinónimo de esta entidad. La media de edad al diagnóstico se sitúa en torno a los 70 años, aunque aproximadamente un 10% de los casos se diagnostican antes de los 50 años. En los últimos años se ha apreciado una ligera tendencia al aumento de la incidencia, probablemente en relación con el envejecimiento poblacional, aunque en la mayoría de los casos no se puede identificar una causa subyacente determinante.

El tratamiento de la enfermedad localizada se basa en la cirugía, la cual puede requerir la extirpación total o parcial del páncreas, así como de algunas estructuras adyacentes, como el duodeno, los ganglios linfáticos o elementos vasculares. Sin embargo, la mayoría de los casos se van a diagnosticar en etapas avanzadas, donde la quimioterapia es la única herramienta disponible. Existen diferentes regímenes de poli o monoquimioterapia destinados a controlar el crecimiento tumoral y prolongar los intervalos libres de progresión y la supervivencia global (SG). No obstante, la supervivencia de esta enfermedad a los 5 años del diagnóstico se estima en torno al 10%.

Son múltiples las alteraciones moleculares encontradas en los pacientes afectados de CP. Entre ellas, se ha establecido que la vía de la autofagia juega un papel fundamental, ya que es un proceso que, aunque generalmente se activa en respuesta a ciertos estímulos como la hipoxia o la ausencia de nutrientes, en las células tumorales puede además

controlar procesos como la obtención de energía, la proliferación y supervivencia celular o incluso la respuesta a terapias citotóxicas, determinando así la supervivencia de los pacientes.

El interés sobre el impacto de la autofagia en el ADP ha aumentado durante los últimos años ya que se ha comprobado que puede determinar el desarrollo del ADP, afectar al pronóstico y la respuesta a muchos de los fármacos utilizados actualmente para tratar la enfermedad afectan a esta vía.

Dado que la autofagia es un factor determinante en la tumorigénesis, es preciso establecer si la existencia de marcadores genéticos en esta vía puede actuar como biomarcador del riesgo a desarrollar ADP. Es un campo de experimentación por explorar hoy en día y que podría conllevar la identificación de marcadores predictivos.

Con el objetivo de avanzar en este campo, se ha realizado un estudio exhaustivo de 55.583 variantes genéticas en 234 genes relacionados con la autofagia (Tabla Suplementaria 1, Anexos) en tres grandes cohortes europeas independientes, que incluyeron 12.754 casos de ADP y 324.926 controles. El metaanálisis de estas poblaciones identificó, por primera vez, la asociación de la variante *BID*_{rs9604789} con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (OR=1.31, $p=9,67 \times 10^{-6}$). Además, confirmó la asociación de las variantes *TP63*_{rs1515496} y *TP63*_{rs35389543} con el riesgo de ADP (OR=0,89, $p=6,27 \times 10^{-8}$ y OR=1,16, $p=2,74 \times 10^{-5}$). Aunque se sabe que *BID* induce la autofagia y *TP63* promueve el crecimiento celular, la motilidad y la invasión, también encontramos que los portadores del alelo *TP63*_{rs1515496G} tenían un mayor número de células T reguladoras FOXP3⁺ Helios⁺ y CD45RA⁺ ($p=7,67 \times 10^{-4}$ y $p=1,56 \times 10^{-3}$,

respectivamente), así como una disminución en los niveles de células T reguladoras CD4+ ($p=7,86 \times 10^{-4}$).

En conclusión, este estudio identifica a *BID* como un nuevo locus de susceptibilidad para ADP y confirma estudios previos que sugieren que el gen *TP63* está involucrado en el desarrollo de ADP. Este estudio también sugiere nuevos mecanismos patogénicos del locus *TP63* en ADP.

ABSTRACT

Pancreatic cancer (PC) is a devastating disease. The most common malignant neoplasm in the pancreas is pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which originates in the epithelium lining the pancreatic ducts responsible for transporting pancreatic juices to the intestine for digestion. PDAC encompasses 85-90% of malignant neoplasms of the pancreas, so it is common in literature to use the general term "pancreatic cancer" as a synonym for this entity. The average age at diagnosis is around 70 years, although approximately 10% of cases are diagnosed before the age of 50. In recent years, a slight increasing trend in incidence has been observed, likely related to the aging population, although in most cases, no specific underlying cause has been identified.

Treatment for localized disease is based on surgery, which may involve total or partial removal of the pancreas, as well as adjacent structures such as the duodenum, lymph nodes, or vascular elements. However, the majority of cases are diagnosed in advanced stages, where chemotherapy is the only available option. Various poly or monotherapy regimens are employed to control tumour growth and extend progression-free intervals and overall survival. Nevertheless, the 5-year survival rate for this disease is estimated to be around 10%.

Multiple molecular alterations have been found in patients with PC. Among them, the autophagy pathway has been established to play a crucial role. While autophagy is generally activated in response to stimuli such as hypoxia or nutrient deprivation, in tumour cells, it can also control processes such as energy acquisition, cell proliferation and survival, or even the response to cytotoxic therapies, thereby influencing patient survival.

Interest in the impact of autophagy on PDA has increased in recent years, as it has been shown to influence PDA development, prognosis, and response to many of the drugs currently used to treat the disease. Given that autophagy is a key factor in tumorigenesis, it is necessary to establish whether genetic markers in this pathway can act as biomarkers for the risk of developing PDA. This remains an unexplored field of research that could lead to the identification of predictive markers.

With the aim of advancing this field, a comprehensive study of 55.583 genetic variant in 234 autophagy-related genes has been conducted across three large independent European cohorts, which included 12.754 PDAC cases and 324.926 controls. The meta-analysis of these populations identified, for the first time, the association of the *BID*_{rs9604789} variant with an increased risk of developing the disease (OR=1,31, $p=9,67 \times 10^{-6}$). In addition, it confirmed the association of the *TP63*_{rs1515496} and *TP63*_{rs35389543} variants with risk of PDAC (OR=0,89, $p=6,27 \times 10^{-8}$ and OR=1,16, $p=2,74 \times 10^{-5}$). Although *BID* is known to induce autophagy and *TP63* promotes cell growth, motility and invasion, we also found that carriers of the *TP63*_{rs1515496G} allele had increased numbers of FOXP3+ Helios+ and CD45RA+ regulatory T cells ($p=7,67 \times 10^{-4}$ and $p=1,56 \times 10^{-3}$, respectively), as well as decreased levels of CD4+ regulatory T cells ($p=7,86 \times 10^{-4}$).

In conclusion, this study identifies *BID* as a new susceptibility locus for PDAC and confirms previous studies suggesting that the *TP63* gene is involved in the development of PDAC. This study also suggests new pathogenic mechanisms of the *TP63* locus in PDAC.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas (CP) es una neoplasia maligna que se origina en los tejidos del páncreas, una glándula clave en los procesos digestivos y en la regulación de los niveles de glucosa en el organismo. Esta enfermedad se caracteriza por su rápido crecimiento y su capacidad de diseminarse a otros órganos, lo que lo convierte en uno de los tipos de cáncer más agresivos y difíciles de detectar en etapas tempranas.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Los datos del estudio GLOBOCAN mostraron que el CP fue la octava neoplasia maligna más diagnosticada en 2020, con 8.211 casos (2,9% del total de diagnósticos) y la tercera causa de mortalidad, con 7.568 defunciones (6,7% del total de defunciones por cáncer) (1). La enfermedad es poco frecuente antes de los 40 años, aunque la incidencia va aumentando progresivamente, con el mayor pico en torno a los 70 años. En cuanto a la distribución por sexos, hay un moderado aumento de riesgo en hombres respecto a las mujeres (ratio 1,3:1) En los últimos 20 años, se aprecia un aumento de la incidencia achacable a causas como el envejecimiento de la población, aunque se considera una enfermedad multifactorial (1).

La supervivencia a 5 años de los pacientes ha mejorado ligeramente en la última década, aunque se sitúa en torno al 10-12%. Esta tendencia podría estar justificada por la mejora en la técnica quirúrgica y la selección de pacientes para el tratamiento sistémico, aunque no ha habido ningún cambio sustancial en el algoritmo terapéutico de la enfermedad avanzada en los últimos 20 años. La mayoría de los casos se diagnostican en estadios avanzados, ya sea a nivel locorregional o a nivel sistémico, estando los casos localizados en la glándula pancreática alrededor de un 10% (2).

Entre los factores de riesgo asociados al CP se encuentran:

- **Tabaco:** se ha publicado un aumento del riesgo en numerosos estudios con un riesgo relativo de al menos 1,5 respecto a los no fumadores. El riesgo es mayor conforme al consumo acumulado de cigarrillos. Se estima que el abandono del hábito tabáquico se asocia a una disminución del riesgo que sería equiparable al de la población no fumadora a partir de los 10-15 años desde el cese. En una estimación de la Universidad de Harvard, el abandono del hábito tabáquico podría evitar hasta el 25% de las muertes por CP en los Estados Unidos (3).
- **Diabetes:** los estudios que evalúan la relación entre diabetes y el ADP han mostrado resultados dispares, ya que la diabetes puede ser una consecuencia del CP, al asociarse con la desestructuración de la glándula. Esto conlleva la pérdida de función, por lo que la diabetes actúa como factor de confusión. No obstante, existen estudios que muestran que los pacientes con diabetes de más de 3 años de evolución tienen un riesgo moderadamente mayor de padecer ADP, con un riesgo relativo inferior a 2. Adicionalmente, se ha observado que, en el momento del diagnóstico del cáncer, es muy frecuente la hiperglucemia (cerca del 40%), por lo que se postula que, en un adulto con diabetes de debut reciente, se considere el cribado de CP (4).
- **Obesidad:** existe una relación clara entre el índice de masa corporal (IMC) y el aumento de riesgo de padecer ADP. Se ha estimado un aumento del riesgo del 34% por cada aumento en 4,6 kg/m², especialmente en los casos con niveles elevados de insulina en ayunas (5). Además, se ha descrito que, en los pacientes con sobrepeso u obesidad, la edad de diagnóstico del ADP se adelanta entre 2 y 6

años y se asocia a una peor SG. Uno de los puntos clave de estos estudios es que el impacto de la obesidad puede medirse aún en los casos diagnosticados desde la adolescencia (6,7).

- **Consumo de alcohol:** históricamente, la contribución del consumo de alcohol sobre el riesgo a desarrollar ADP se ha confundido con el consumo de tabaco. Los datos comunicados de los grandes consorcios internacionales no han mostrado una asociación significativa entre el consumo moderado de alcohol y ADP frente a los no consumidores. Sí se objetiva un aumento del riesgo en los grandes consumidores, con un riesgo relativo mayor de 2 (8).
- **Dieta:** no existen datos robustos de la contribución de la dieta sobre el riesgo de desarrollar un ADP. La dieta rica en grasas saturadas y carnes procesadas se ha postulado como un factor de riesgo en varios estudios, pero no en todos. En los estudios que han evaluado las dietas con elevadas cantidades de fruta y verdura fresca han demostrado consistentemente su efecto beneficioso. El estudio NIH-AARP mostró una disminución del riesgo de padecer ADP (HR=0,85) entre la población que seguía de manera estricta recomendaciones de dieta sana frente a la que llevaba una dieta rica en grasas saturadas, azúcares y ultraprocesados. El beneficio fue especialmente reseñable en aquellos con un IMC superior a 30 (9).
- **Pancreatitis crónica:** independientemente de la causa, los individuos afectados de pancreatitis crónica tienen un moderado aumento del riesgo de padecer ADP. La entidad de este aumento es difícil de determinar ya que los diferentes estudios han establecido rangos muy amplios de aumento del riesgo, pero se asume que es al menos el doble que el de la población sana (10).

- **Fibrosis quística:** los individuos que padecen fibrosis quística tienen un mayor riesgo de padecer numerosas neoplasias del tracto digestivo, como tumores del intestino delgado, la vía biliar, de colon y, también ADP. Se estima un riesgo 6 veces superior al de la población general. El riesgo es mayor en aquellos casos que se someten a trasplante de pulmón, teniendo un riesgo hasta 5 veces mayor que los casos no trasplantados (11).
- **Grupo sanguíneo ABO:** se ha establecido un mayor riesgo a desarrollar ADP en los no portadores de alelos O que en aquellos que lo portan, habiendo efecto protector tanto en heterocigosis como en homocigosis. No se conoce el mecanismo etiológico subyacente a este hecho, existiendo varias teorías como la menor colonización por cepas de *Helicobacter pylori* en el grupo O. En comparación con el grupo OO, el grupo AO tiene un aumento del riesgo del 33%, el AA del 61%, el BO del 45% y el BB del 142% (12).
- **Factores hereditarios:** entre el 5 y el 10% de los casos de ADP presenta agregación familiar. Son múltiples los síndromes hereditarios en los que se ha publicado un aumento del riesgo de ADP además de otras neoplasias. El estudio a nivel germinal de los casos con agregación familiar o en los que se presentan por debajo de los 60 años está recogido en las guías internacionales, tanto para el asesoramiento genético del paciente y sus familias, como por las implicaciones terapéuticas que pueden derivarse de los resultados (13).

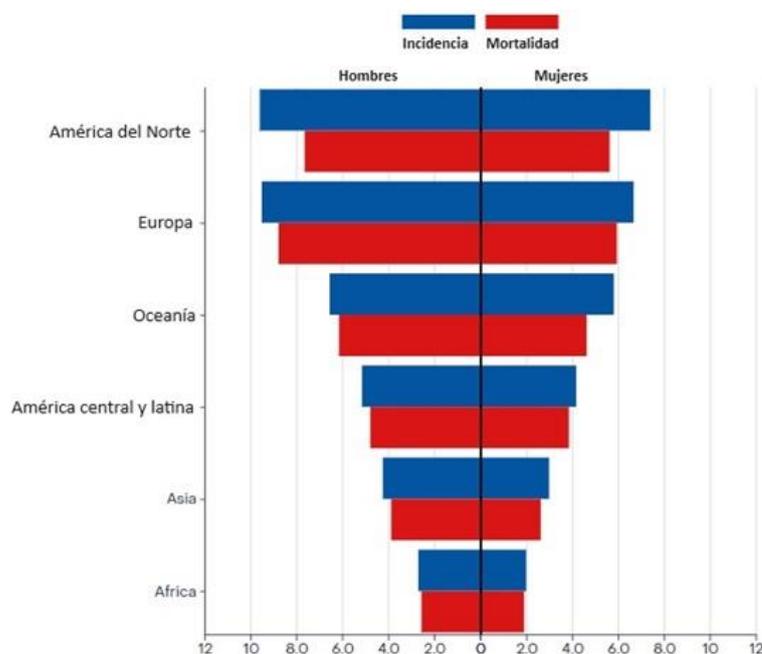


Figura 1. Tasa estandarizada por 100.000 de incidencia y mortalidad por sexos de cáncer de páncreas. *Adaptado de Cancer Today (https://gco.iarc.fr/today)*

1.3 CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

El páncreas es un órgano que puede dar lugar a numerosos tipos de tumores, tanto benignos como malignos. La clasificación de la *World Health Organization* (WHO) es de las más empleadas y se basa en la caracterización histológica y morfológica de los tumores (14).

Dentro de las neoplasias pancreáticas, hay que distinguir si se originan en el páncreas exocrino, encargado de la secreción y transporte de las enzimas digestivas que van a verterse al tubo digestivo en forma de jugos pancreáticos para su uso en la digestión; o en el páncreas endocrino, que se estructura en islotes dentro del páncreas exocrino y que se encarga de la producción de diferentes hormonas, como la insulina, el glucagón o la somatostatina, entre otras (15). El páncreas exocrino está formado por estructuras

acinares encargadas de la producción de enzimas digestivas y estructuras ductales encargadas de vehiculizarlas hasta el conducto pancreático principal.

La neoplasia benigna más frecuente es el cistoadenoma seroso. Se subdivide en varias categorías: el adenoma seroso microquístico, el adenoma seroso sólido, el adenoma seroso oligoquístico mal definido y la neoplasia quística asociada al síndrome de Von Hippel-Lindau (16). Todas estas variantes tienen un comportamiento clínico similar, siendo en la mayoría de los casos un hallazgo casual en pruebas de imagen. En los casos que producen síntomas, éstos pueden ser digestivos como el dolor abdominal, la dispepsia, la presencia de vómitos, la dificultad para la digestión o la existencia de una masa epigástrica palpable que, ocasionalmente, puede provocar la compresión de estructuras adyacentes, como el tubo digestivo o elementos vasculares. Además, este tipo de estructuras pueden romperse provocando pancreatitis o incluso peritonitis que requiere cirugía urgente. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la cirugía suele ser utilizada más para el diagnóstico que para el tratamiento, no necesitando más maniobras al tratarse de una entidad benigna (17).

Dentro de las neoplasias malignas del páncreas, el adenocarcinoma ductal es la entidad más frecuente, constituyendo en torno al 90% de los casos. Se caracteriza por presentar una masa sólida de bordes mal definidos por la invasión del tejido pancreático adyacente. A nivel inmunohistoquímico, se caracteriza por expresar citoqueratinas 7,8/18 y 19, así como CEA, MUC1 y *p53* y presentar negatividad para citoqueratina 20, MUC2, vimentina y marcadores de estirpe neuroendocrina como sinaptofisina o cromogranina.

Páncreas endocrino

Páncreas exocrino

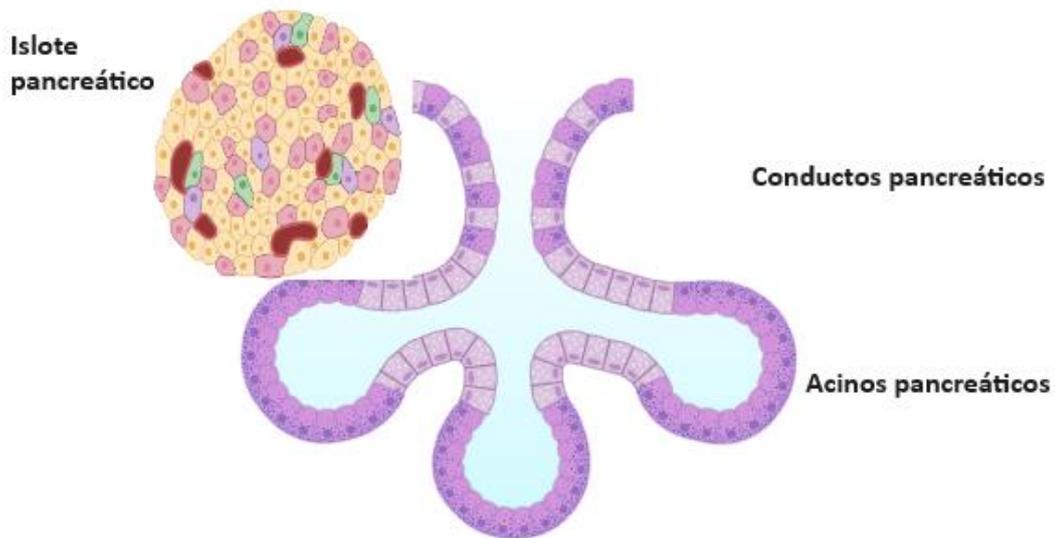


Figura 2. Esquema unidad funcional del páncreas endocrino y exocrino.

El páncreas endocrino está constituido por los islotes pancreáticos, grupos de células encargadas de la producción hormonal. El páncreas exocrino se constituye por elementos saculares denominados acinos que confluyen en conductos de progresivo mayor calibre para vehicular los jugos pancreáticos hacia el tubo digestivo. Generado con Biorender

Dentro del ADP se han descrito múltiples variantes, la mayoría de ellas observadas en un porcentaje muy pequeño de casos (14):

- **Adenocarcinoma coloide:** caracterizado por abundantes lagunas de mucina que representan al menos el 80% de la neoplasia en las que se encuentran suspendidas las células tumorales.
- **Adenocarcinoma medular:** se caracteriza por presentar sábanas de células con citoplasma abundante eosinófilo y crecimiento sincitial, con infiltración linfocitaria profusa. Entre un 20 y un 50% de los casos se asocia a inestabilidad de microsatélites.

- **Carcinoma adenoescamoso:** se requiere una diferenciación escamosa superior al 30% para su diagnóstico. La expresión de p40 y p63 es especialmente llamativa en las regiones escamosas.
- **Carcinoma indiferenciado con células gigantes tipo osteoclasto:** se caracteriza por la presencia de dos poblaciones celulares, una de células epiteliales mononucleares indiferenciadas y otra de células gigantes multinucleadas benignas.

El carcinoma acinar es un tumor maligno poco frecuente caracterizado por presentar una aparentemente bien circunscrita masa, frecuentemente encapsulada. Tiene una población tumoral que forma estructuras acinares en mayor o menor medida. A nivel inmunohistoquímico, expresa citoqueratinas 7,8/18 y 19 así como marcadores acinares como bcl y tripsina, los cuales son imprescindibles para su diagnóstico.

El pancreatoblastoma es un tumor muy infrecuente que ocurre principalmente en niños, aunque pueden verse casos en adultos. Se caracteriza por una diferenciación multilínea que recuerda al páncreas embrionario, pudiendo observarse áreas ductales, acinares, neuroendocrinas, estromales e inmaduras. Dependiendo de la zona va a expresar los marcadores inmunohistoquímicos característicos de la diferenciación expresada (14).

1.4 PRESENTACIÓN CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

No existe ningún signo ni síntoma específico de CP y en la mayoría de los casos el diagnóstico llega en fases avanzadas de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas del ADP dependen de la localización del tumor. Aproximadamente el 70% se presentan en la cabeza del páncreas, lo que se asocia con más frecuencia a ictericia, esteatorrea o

pérdida de peso. La presencia de ictericia indolora obliga a descartar la presencia de un tumor en la cabeza del páncreas. El dolor es más frecuente al diagnóstico en los tumores de cuerpo y cola, aunque puede estar presente hasta en el 80% de los casos al diagnóstico. Suele tener una localización epigástrica, en ocasiones irradiada hacia campos epigástricos o a la espalda y suele empezar de manera insidiosa e ir aumentando de intensidad con la progresión de la enfermedad. Suele empeorar con la ingesta y el decúbito. La astenia y la pérdida de peso son síntomas inespecíficos que aparecen al diagnóstico en la mayoría de los pacientes, pero que en muy pocas ocasiones son los que guían el diagnóstico. En algunos casos, se llega al diagnóstico por un cuadro de trombosis, secundario al estado de hipercoagulabilidad que frecuentemente acompaña al ADP o por un cuadro de diabetes de reciente diagnóstico, debido a la pérdida de función de los islotes pancreáticos por la distorsión arquitectural de la glándula por la neoplasia. La clínica generada por la enfermedad metastásica dependerá de la localización de las metástasis. La afectación más frecuente es la hepática, que puede cursar con dolor en hipocondrio, ictericia o señales de insuficiencia hepática como astenia, anorexia o ascitis, la cual también puede ser a consecuencia de la afectación peritoneal, segunda localización más frecuente. La afectación pulmonar es poco frecuente que curse con síntomas de insuficiencia respiratoria o derrame pleural al diagnóstico, pudiendo observarse en fases avanzadas de la historia natural de la enfermedad. El dolor por afectación ósea es poco frecuente (18).

El hallazgo incidental de un CP en una prueba de imagen solicitada por otro motivo es un hecho poco frecuente y suele aparecer más en entidades menos agresivas como los carcinomas neuroendocrinos. La incorporación de las medidas de cribado en los casos con antecedentes familiares podría ayudar a establecer un diagnóstico precoz y hacer más común este punto (19).

Para el diagnóstico, es precisa la realización de una prueba de imagen que evalúe la anatomía pancreática en busca de lesiones ocupantes de espacio. La prueba más utilizada es la ecografía dada su facilidad y rapidez para su realización, aunque la sensibilidad para tumores menores de 3 cm es limitada y no en todos los pacientes es posible una adecuada visualización de la glándula. El TAC es el “*gold standard*” en la evaluación del páncreas. Permite evaluar la relación con las estructuras vasculares que van a definir la resecabilidad, así como la afectación ganglionar local y la presencia de enfermedad metastásica hepática o peritoneal. La resonancia magnética tiene una sensibilidad similar y se suele realizar en casos dudosos o con componente eminentemente quístico. Una vez visualizada una lesión pancreática sospechosa, la toma de biopsias puede realizarse mediante técnicas de ecoendoscopia, la cual puede usarse además en los casos en los que requieran drenaje biliar para colocar un *stent* para solucionar los casos asociados a ictericia obstructiva (20).

El papel del CA 19.9 en el diagnóstico del CP es controvertido. Sus niveles pueden verse elevados por múltiples causas, especialmente en aquellas con afectación de la vía biliar, así como en otros tumores digestivos. Los niveles de este marcador tumoral se relacionan con el volumen tumoral, pudiendo no estar alterados en casos con tumores pequeños. En casos con niveles más elevados, lo más habitual es que se asocie con síntomas que guíen el proceso diagnóstico, por lo que sus niveles no suelen condicionar cambios en dicho proceso. No obstante, sí que es recomendable una determinación de CA 19.9 basal al diagnóstico puesto que la dinámica de este marcador puede ayudar a evaluar la evolución de la enfermedad. Actualmente, no hay evidencia suficiente para incorporar otros marcadores al manejo de los pacientes con ADP (21).

1.5 ESTADIFICACIÓN

La estadificación del ADP se lleva a cabo mediante la clasificación TNM del *American Joint Committee of Cancer*. Actualmente, se utiliza la versión 8ª, revisada y publicada en 2017.

El sistema TNM se basa en la aplicación de tres parámetros: el tamaño del tumor primario (T); la afectación ganglionar (N) y la presencia de metástasis (M).

En cuanto al ADP, la clasificación TNM establece la siguiente clasificación:

T0: sin evidencia de tumor primario

Tis: carcinoma in situ. Incluye cualquier entidad limitada al epitelio, como las neoplasias intraepiteliales de alto grado (PanIN), las neoplasias mucinosas papilares intraductales, las neoplasias tubulopapilares intraductales o las neoplasias mucinosas intraquísticas con displasias de alto grado.

T1: el tumor primario mide 2 centímetros o menos en su mayor dimensión.

T1a: Tumor primario menor de 0,5 cm

T1b: Tumor primario entre 0,5 y 1 cm

T1c: Tumor primario entre 1 y 2 cm.

T2: el tumor primario mide más de 2 centímetros, pero no más de 4 en su mayor dimensión.

T3: el tumor primario mide más de 4 cm en su mayor dimensión.

T4: el tumor invade estructuras importantes cercanas al páncreas, como la arteria celíaca, la arteria mesentérica superior o la arteria hepática común, independientemente de su tamaño.

N0: Sin evidencia de afectación ganglionar

N1: Afectación entre 1 y 3 ganglios locorregionales

N2: Afectación de 4 o más ganglios locorreionales

M0: Sin evidencia de afectación metastásica a distancia

M1: Metástasis a distancia

En base a esta clasificación, se establece un sistema de estadificación en función del pronóstico.

- **Estadio IA:** T1N0M0
- **Estadio IB:** T2N0M0
- **Estadio IIA:** T3N0M0
- **Estadio IIB:** T1-3N1M0
- **Estadio III:** T1-3N2M0 // T4N+M0
- **Estadio IV:** T1-4N0-2M1

Conforme se avanza en el estadio, el pronóstico empeora. La octava edición de la clasificación TNM se ha validado de manera internacional y prospectiva, aunque se han identificado varias limitaciones que requerirán modificaciones en nuevas ediciones (22)

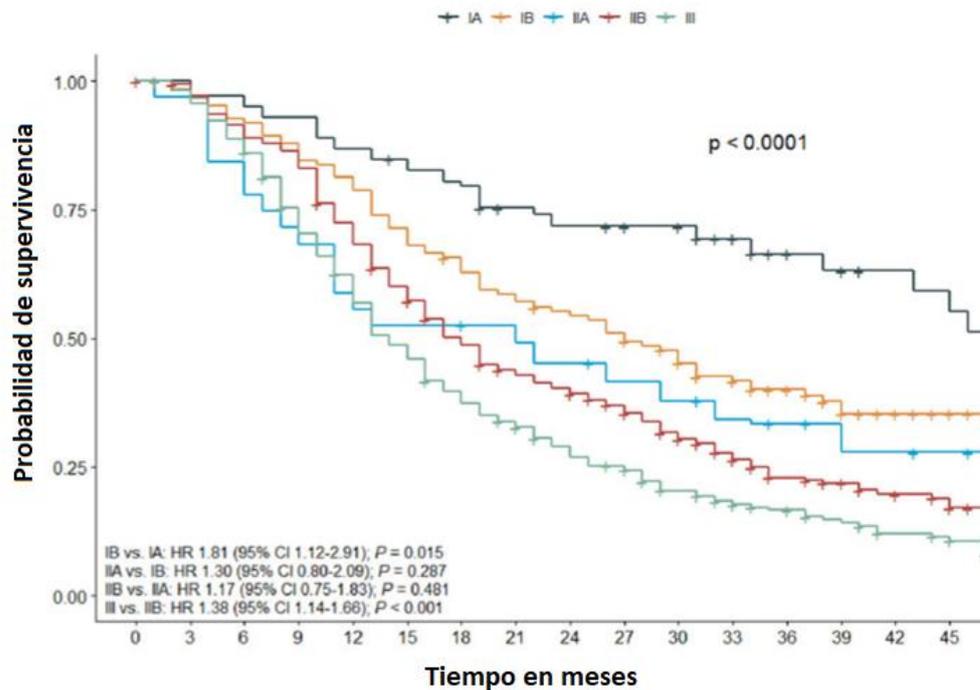


Figura 3. Curvas de supervivencia por estadio según la 8ª clasificación TNM.

1.6 TRATAMIENTO ENFERMEDAD LOCALIZADA

La base del tratamiento del ADP localizado es la cirugía. No obstante, no todos los tumores localizados van a poder researse y se han establecido unos criterios de reseabilidad para evaluar la conveniencia de la intervención. Se estima que no más del 20% de los casos son reseables de entrada.

El objetivo de la cirugía es conseguir extirpar todo el tejido tumoral y obtener márgenes libres. La anatomía pancreática es compleja y presenta una relación estrecha con numerosas estructuras vasculares. La evaluación de esta relación es el principal factor para tener en cuenta para evaluar la reseabilidad, la cual suele realizarse mediante pruebas de imagen, ya sea TAC o RMN. Se considera aceptado que la afectación de más de 180° de la circunferencia del vaso, la deformidad del contorno o el cambio del calibre del vaso son criterios de invasión vascular.

Los criterios de reseccabilidad del cáncer de páncreas distinguen entre la afectación arterial y venosa, ya que ésta última es potencialmente reseccable (23).

La técnica quirúrgica para emplear dependerá de la localización del tumor y de la cantidad de glándula afectada. En los casos con afectación de la cabeza del páncreas, el estándar es la técnica de Whipple o duodenopancreatectomía cefálica, la cual implica la extirpación de la cabeza del páncreas, parte del duodeno, la vesícula y el conducto biliar común con posterior reconstrucción del tránsito intestinal. En los casos con afectación de cuerpo o cola del páncreas, la técnica estándar es la pancreatectomía distal que extirpa la glándula a la izquierda del eje mesentérico portal. En casos con afectación mayor, es posible tener que realizar una pancreatectomía total (24).

Además, la cirugía debe ir asociada con linfadenectomía locorregional que incluya al menos los ganglios duodenales y pancreáticos anteriores y posteriores, así como la disección del lado derecho del ligamento hepatoduodenal y del lado derecho de la arteria mesentérica superior. La realización de una linfadenectomía más extensa no ha demostrado beneficio en supervivencia y sí se asocia a una tendencia a mayor morbilidad quirúrgica por lo que no debería realizarse de manera rutinaria (25).

La administración de quimioterapia perioperatoria es una maniobra que se ha explorado especialmente en los casos localmente avanzados irresecables o borderline. En los casos reseccables, la opción preferencial es la cirugía, aunque en algunos casos podría plantearse comenzar con quimioterapia como en casos con escasa disponibilidad quirúrgica como en la reciente pandemia por COVID o en casos con enfermedades concomitantes que dificulten la recuperación quirúrgica o aumenten la morbilidad (desnutrición, trombosis reciente, cardiopatías, etc).

	ARTERIAL	VENOSA
RESECABLE	<ul style="list-style-type: none"> - Claro plano graso de clivaje entre la neoplasia y las estructuras vasculares de la arteria mesentérica superior (AMS), la arteria hepática (AH) y el tronco celíaco (TC) 	<ul style="list-style-type: none"> - Claro plano graso de separación entre la neoplasia y las estructuras vasculares de la vena mesentérica superior (VMS) o la vena porta - Contacto menor de 180° de la circunferencia de la VMS o la porta sin deformidad del contorno del vaso
BORDERLINE	<ul style="list-style-type: none"> - Contacto focal con la AH sin extensión a TC - Contacto menor de 180° de la circunferencia de AMS - Contacto menor de 180° de la circunferencia de TC 	<ul style="list-style-type: none"> - Contacto mayor de 180° o menor si se asocia a deformidad, estenosis u oclusión de VMS o porta. - Contacto focal con la vena cava inferior
IRRESECABLE	<ul style="list-style-type: none"> - Contacto mayor de 180° o menor si se asocia a deformidad, estenosis u oclusión de AMS y/o TC - Contacto focal con la primera rama yeyunal de la AMS - Invasión aórtica 	<ul style="list-style-type: none"> - Afectación de VMS o porta no candidata a reconstrucción venosa - Contacto con vena de drenaje yeyunal más proximal que drena a VMS

Es criterio de irresecabilidad la presencia de metástasis a distancia. La invasión por contigüidad de estructuras adyacentes como estómago, bazo, suprarrenal o riñón no son criterios de irresecabilidad *per se* si son resecables en base a la relación vascular

Tabla 1. Criterios de resecabilidad en CP localizado.

El manejo de la enfermedad *borderline* y localmente avanzada irresecable no tiene un estándar y no hay un consenso en las guías de manejo internacionales ni en el esquema, ni en la duración ni en la valoración de la respuesta en este escenario. Las herramientas terapéuticas disponibles son la radioterapia y la quimioterapia, solas o en combinación,

destinadas a inducir respuesta tumoral suficiente para mejorar las posibilidades de radicalidad de una intervención subsecuente.

La quimioterapia perioperatoria en el ADP suele emplearse mediante la combinación de varios fármacos. El esquema FOLFIRINOX combina la administración de 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorin, irinotecán y oxaliplatino y ha demostrado ser un esquema activo en ADP metastásico. Dada su actividad, se ha explorado su uso en la enfermedad localizada irresecable en numerosos estudios, la mayoría de ellos de pequeño tamaño y sin brazo control ni aleatorización. En un metaanálisis de 13 de estos estudios, se ha descrito una tasa de conversión a resecabilidad de hasta un 26%, consiguiendo una cirugía R0 en 3 de cada 4 de estos pacientes (25). En los casos *borderline*, únicamente se disponen de series de casos retrospectivos, aunque la administración de FOLFIRINOX se asoció con una tasa de resección completa del 55%. Muchos de estos casos recibieron tratamiento con radioterapia tras la intervención, por lo que no es posible determinar el grado de contribución que cada uno de estos tratamientos arroja en este escenario (26).

El esquema FOLFIRINOX se asocia con una elevada toxicidad hematológica, digestiva, neurológica y cutánea. No todos los pacientes van a ser candidatos a este esquema, el cual va a estar restringido a pacientes con puntuaciones 0 o 1 en la escala del *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), sin comorbilidades y, para muchos centros sanitarios, restringido a menores de 70 años.

Para aquellos pacientes no candidatos a tratamiento con FOLFIRINOX, la opción preferida es la combinación de gemcitabina y nab-paclitaxel. No obstante, esta es una combinación muy poco explorada en ensayos en enfermedad localizada. El ensayo SWOG S1505 es un ensayo fase II que evaluó el tratamiento neoadyuvante con

FOLFIRINOX o gemcitabina y nab-paclitaxel a elección del investigador. El objetivo principal era superar la SG a 2 años del 40%, considerada como control histórico. Los resultados de ambos brazos fueron del 47% y del 48% respectivamente por lo que se considera que no hay un beneficio significativo, aunque sí que se asoció con mayor tasa de cirugía R0, menor positividad de los márgenes y menor afectación ganglionar, por lo que los investigadores concluyen que es una estrategia que debe continuar siendo explorada (27).

El estudio NEOLAP comparó la actividad de la combinación de gemcitabina y nab-paclitaxel con el tratamiento secuencial de gemcitabina y nab-paclitaxel seguido de FOLFIRINOX en pacientes localmente avanzados. En este ensayo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la tasa de reconversión a cirugía, tasa de respuesta por imagen o SG, aunque se mostraron respuestas histológicas más profundas en el brazo que incluía FOLFIRINOX (28).

En aquellos casos en los que se pueda realizar cirugía primaria, todas las guías recomiendan la adición de quimioterapia adyuvante, independientemente del estadio.

El estudio CONKO-001 evaluó la adición de gemcitabina al tratamiento quirúrgico del ADP localizado. Aunque los resultados fueron modestos, se observó que el beneficio de la adición de gemcitabina se mantiene a lo largo del tiempo, con un tasa de SG a los 5 años del 21% frente al 10% del brazo de observación y del 12,2% frente al 7,7% a los 10 años (29).

Para mejorar estos resultados se han explorado varias combinaciones:

- **Gemcitabina y capecitabina:** el estudio ESPAC4 comparó la combinación frente a la monoterapia con gemcitabina. Los resultados muestran un beneficio en

SG a favor de la combinación, con un perfil de toxicidad manejable. La tasa de supervivencia a 5 años fue del 28% frente al 17% de la monoterapia (30).

- **Gemcitabina y nab-paclitaxel:** el estudio APACT comparó esta combinación frente a la monoterapia con gemcitabina. Aunque falla en su objetivo principal de prolongar el intervalo libre de enfermedad, sí que se asoció con un aumento de la SG, con una tasa a 5 años del 38% frente al 31% de la monoterapia (31).

- **FOLFIRINOX:** el estudio PRODIGE-24 comparó el esquema FOLFIRINOX con la monoterapia con gemcitabina. Los resultados favorecen el esquema de combinación en todos los objetivos, supervivencia libre de enfermedad, SG (54 frente a 36 meses) y tasa de supervivencia a 5 años (43% frente a 31%) (32).

Es destacable que los ensayos más modernos se asocian a una mejor tasa de supervivencia a 5 años, fruto de la mejora en las técnicas quirúrgicas, las segundas líneas de tratamiento y la optimización en el manejo de la enfermedad y sus comorbilidades.

1.7 TRATAMIENTO ENFERMEDAD METASTÁSICA

Las opciones terapéuticas actuales contra el ADP metastásico son limitadas por lo que el diseño del tratamiento óptimo debe ser cuidadoso para permitir obtener el máximo beneficio de todas las líneas de tratamiento disponibles. Es importante destacar que, al ser una enfermedad muy agresiva y con pocas opciones terapéuticas, se debe buscar la inclusión de pacientes en ensayos clínicos que permitan obtener alternativas terapéuticas y búsqueda de biomarcadores de respuesta.

La primera línea de tratamiento de la enfermedad avanzada no está estandarizada y la elección del tratamiento va a depender de factores como el estado general del paciente, sus comorbilidades, las alteraciones moleculares que puedan estar presentes y el deseo del paciente una vez se le informen sobre las diferentes alternativas.

En líneas generales, los tratamientos de combinación de varios fármacos quimioterápicos van a asociarse con mayores tasas de respuesta y de supervivencia que las monoterapias, aunque a costa de un perfil de toxicidad mayor.

Las opciones terapéuticas en primera línea son:

- **FOLFIRINOX**: el papel de este tratamiento de combinación en el ADP metastásico se testó en el ensayo fase III ACCORD 11. En él, se incluyeron 342 pacientes randomizados para recibir el tratamiento con FOLFIRINOX o monoterapia con gemcitabina hasta progresión, toxicidad inaceptable o un mínimo de 6 meses. El tratamiento de combinación mejoró la SG de 6,8 a 11,1 meses respecto de la monoterapia con una disminución del riesgo de muerte del 43%. Adicionalmente, la supervivencia libre de progresión (SLP) ascendió desde los 3,3 a los 6,4 meses y la tasa de respuesta objetiva de la enfermedad mejoró del 9,4 al 31,6%. No obstante, la toxicidad fue significativamente mayor en el brazo de combinación, con un porcentaje de toxicidad moderada-severa del 46% frente al 21% del brazo de gemcitabina en monoterapia. Los resultados de este estudio apoyan el uso de este esquema en aquellos pacientes con buen estado general como primera maniobra de tratamiento sistémico en ADP metastásico (33).

- **Gemcitabina + nab-paclitaxel**: la combinación se exploró frente a la monoterapia con gemcitabina en el estudio MPACT hasta progresión o toxicidad inaceptable. Se incluyeron un total de 861 pacientes. La combinación se asoció a

una mayor tasa de respuestas (23 vs 7%), una mayor SLP (5,5 vs 3,7 meses) y una mayor SG (8,5 vs 6,7 meses). La toxicidad moderada-severa fue mayor en el brazo de combinación (77 vs 51%). En general, en aquellos pacientes en los que no se considera el tratamiento con FOLFIRINOX, este esquema es el más empleado (34).

- **Gemcitabina + capecitabina:** esta combinación se ha explorado en varios ensayos frente a la monoterapia con gemcitabina. La combinación se asoció a un aumento en tasa de respuestas, pero el beneficio en supervivencia fue numéricamente discreto y estadísticamente no significativo. El análisis combinado de todos los ensayos mostró un beneficio modesto a favor de la combinación y podría ser una opción en algunos casos en primera línea (35).

El tratamiento en el ADP en primera línea es hasta progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable o deseo del paciente. En aquellos casos que no progresan tras al menos 16 semanas de FOLFIRINOX y que sean portadores de mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas en *BRCA*, el tratamiento con el inhibidor de PARP olaparib, se ha asociado con un aumento en SLP (7,4 vs 3,8 meses) aunque no con un aumento de SG a pesar de no estar permitido el crossover tras progresión. No obstante, el tratamiento con olaparib se asoció con una tasa de supervivencia a tres años del doble (34 vs. 18%) por lo que recibió la aprobación de la FDA para el tratamiento de mantenimiento del ADP portador de mutaciones en *BRCA* (36).

Tras la progresión a primera línea, las opciones de tratamiento son limitadas, no existen ensayos randomizados que las comparen y, en general, se asocian a tasas de respuesta pobres (no más del 20%) y a una tasa de supervivencia de alrededor de 6 meses.

La decisión del tratamiento va a estar determinada por la situación clínica del paciente y por la elección de la primera línea de tratamiento (37).

En aquellos casos que reciben FOLFIRINOX en primera línea y mantienen buen estado general, la opción preferida es la combinación de gemcitabina y nab-paclitaxel, aunque no existen datos de que, en este escenario, haya beneficio para un tratamiento de combinación frente a una monoterapia con gemcitabina.

Para los casos que reciben gemcitabina y nab-paclitaxel, hay más opciones, aunque no comparadas entre sí y cuya elección dependerá del perfil de toxicidad de estos.

El estudio NAPOLI-1 evaluó la combinación de irinotecán nanoliposomal y 5-FU frente a la monoterapia de ambas opciones. La combinación se asoció a un aumento de SG para la combinación frente a la monoterapia con 5-FU (6,1 vs 4,2 meses) con una disminución del riesgo de muerte del 33%. La monoterapia con irinotecán nanoliposomal no mostró diferencias frente a 5-FU, aunque sí un peor perfil de toxicidad, por lo que su uso no se recomienda (38).

La combinación de oxaliplatino y 5-FU es una de las opciones más empleadas tras progresión a esquemas con gemcitabina. La combinación se mostró más efectiva que la monoterapia con 5-FU en el estudio CONKO-003. El tratamiento de combinación se asoció con beneficio en SG (5,9 vs. 3,3 meses) aunque con peor perfil de toxicidad, especialmente a expensas de neuropatía periférica, una de las principales toxicidades limitantes de nab-paclitaxel, por lo que es un esquema que se reserva para aquellos pacientes con neurotoxicidad recuperada o leve (39).

En líneas posteriores de tratamiento, no existe un estándar de tratamiento ni hay evidencia de beneficio para ningún esquema de quimioterapia. Lo más habitual en aquellos pacientes que mantengan buen estado general es el empleo de monoterapia con

gemcitabina, 5-FU o paclitaxel. Es vital el soporte precoz por las unidades de cuidados continuos y paliativos para el control sintomático de estos pacientes, ya que, en muchos casos, los síntomas se vuelven refractarios de manera precoz y su abordaje es complejo y requiere un enfoque holístico para el tratamiento físico y psicológico del paciente y de su entorno (37).

1.8 GENÉTICA DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

En el CP existe un componente genético que se ha ido descifrando con el avance de la genética molecular y la llegada de técnicas como los GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) y la NGS (*Next Generation Sequencing*). Estas técnicas nos han permitido conocer el genoma completo de los pacientes, facilitando así la identificación de mutaciones de alta penetrancia y variación común asociada con el desarrollo de la enfermedad, pero también con la respuesta a los tratamientos y la supervivencia.(40)

1.8.1 MUTACIONES GERMINALES (VARIACIÓN RARA)

Las mutaciones deletéreas en variantes raras representan un área de interés creciente en la genética humana. A diferencia de las variantes comunes, que generalmente tienen efectos modestos en el fenotipo y están sujetas a selección natural, las variantes raras tienen una historia evolutiva menos clara y pueden surgir de mutaciones recientes o eventos de recombinación. Las mutaciones deletéreas en estas variantes raras pueden ser responsables de enfermedades monogénicas o contribuir a la susceptibilidad a enfermedades multifactoriales. Debido a su baja frecuencia, para la detección y caracterización de estas mutaciones se requieren técnicas avanzadas de secuenciación y

análisis bioinformático. Se han descrito asociaciones en numerosos genes, recogidos en la tabla 2 (41).

Gen	Cromosoma	Banda	Posición
<i>APC</i>	5	q22.2	112,737,885-112,846,239
<i>ATM</i>	11	q22.3	108,222,832-108,369,099
<i>BARD1</i>	2	q35	214,725,646-214,809,683
<i>BRCA1</i>	17	q21.31	43,044,295-43,125,483
<i>BRCA2</i>	13	q13.1	32,315,474-32,400,266
<i>BRIP1</i>	17	q23.2	61,681,266-61,863,521
<i>CDH1</i>	16	q22.1	68,737,292-68,835,537
<i>CDKN2A</i>	9	p21.3	21,967,753-21,975,098
<i>CHEK2</i>	22	q12.1	28,687,743-28,741,820
<i>EPCAM</i>	2	p21	47,369,148-47,387,034
<i>FANCC</i>	9	q22.32	95,099,054-95,317,709
<i>FANCM</i>	14	q21.2	45,135,930-45,200,890
<i>MEN1</i>	11	q13.1	64,803,516-64,810,716
<i>MITF</i>	3	p13	69,739,435-69,968,336
<i>MLH1</i>	3	p22.2	36,993,332-37,050,918
<i>MRE11</i>	11	q21	94,415,578-94,493,908
<i>MSH2</i>	2	p21	47,402,969-47,483,228
<i>MSH6</i>	2	p16.3	47,783,082-47,810,101
<i>MUTYH</i>	1	p34.1	45,329,242-45,340,440
<i>NBN</i>	8	q21.3	89,933,336-89,984,716
<i>NF1</i>	17	q11.2	31,094,927-31,377,677
<i>PALB2</i>	16	p12.2	23,603,170-26,641,310
<i>PMS2</i>	7	p22.1	5,970,925-6,009,049
<i>RAD50</i>	5	q31.1	132,556,977-132,646,349
<i>RAD51C</i>	17	q22	58,692,602-58,735,611
<i>TP53</i>	17	p13.1	7,668,402-7,687,538
<i>VHL</i>	3	p25.3	10,141,008-10,152,220

Tabla 2. Variantes raras deletéreas descritas en la literatura en estudios poblacionales. Adaptada de Gentiluomo, Seminars in Cancer Biology 2020

1.8.2 POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO

Se denominan polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) a las variaciones en una sola base del ADN. Son la forma más común de variación entre individuos y hay descritos millones de variantes en las bases de datos genéticas. Aunque la mayoría de estos polimorfismos no suponen un impacto funcional aparente en la función proteica, es creciente el número de variantes que pueden suponer cambios en la expresión génica o en la estructura de las proteínas y que pueden influir en la susceptibilidad a padecer enfermedades complejas o afectar a su pronóstico. Es creciente el número de entidades en las que los estudios de SNPs han mostrado datos relevantes, como la diabetes, la enfermedad cardiovascular, las enfermedades neurodegenerativas o el cáncer (42). No obstante, dado su enorme variabilidad interindividual, es muy complejo el poder encontrar asociaciones robustas sobre el papel individual que aporta cada polimorfismo, así como las interrelaciones que pueden tener con otros, por lo que son necesarios tamaños muestrales muy grandes. Además, las diferencias étnicas entre distintas poblaciones pueden suponer problemas de validación externa, además de que factores ambientales pueden influir de manera diferente entre ellas y dificultar la identificación de la verdadera contribución de un cierto SNP en la determinación del fenotipo. (42)

Otro concepto importante en el estudio de SNPs es el de herencia poligénica, por la que, un mismo fenotipo va a estar influenciado por varios genes. En el campo del cáncer, es un punto especialmente relevante, ya que son múltiples los genes que pueden influenciar en una misma entidad y la contribución individual de cada SNP puede quedar diluida ante la gran cantidad de variables en liza (43). Para ello, se realizan estudios mediante GWAS, que permite la identificación de una gran cantidad de SNP al mapear

el genoma completo. Los SNPs asociados con el riesgo de ADP comunicados en la literatura se recogen en la tabla 3 (44).

Gen	SNP			
<i>XRCC4</i>	rs2075685	rs1805377		
<i>XRCC1</i>	rs25487	rs1799782		
<i>XPC</i>	rs3731055	rs2228001		
<i>VEGF</i>	rs833061	rs2010963		
<i>VDR</i>	rs2228570	rs1544410		
<i>TP53</i>	rs9895829			
<i>FTO</i>	rs9939609			
<i>ERCC1</i>	rs11615	rs3212986		
<i>ERCC2</i>	rs13181			
<i>ERCC4</i>	rs6498486			
<i>CTLA-4</i>	rs231775			
<i>COX-2</i>	rs20417			
<i>CDKN2A/B</i>	rs3731257	rs3731249	rs3731239	rs3731211
	rs3218009	rs3217992	rs3217986	rs2811710
	rs2811708	rs2518719	rs11515	rs1063192
<i>ABO</i>	rs657152	rs505922	rs495828	
<i>TERT</i>	rs2736098	rs401681	rs2853677	
<i>SAMD12-TNFRSF11B</i>	rs11988997			
<i>PRSS1-PRSS2</i>	rs10273639			
<i>KIAA1462MTPAP</i>	rs2995271			
<i>MUMILI-CXorf57</i>	rs37974251			
<i>MORC4</i>	rs12837024			
<i>OGG1</i>	rs1052133			
<i>HOTAIR</i>	rs4759314			
<i>E-cadherina</i>	rs16260			
<i>TNF-α</i>	rs1800629			
<i>MTHFR</i>	rs1801133			
<i>IGF-1</i>	rs2288378	rs5742714		
<i>HIF-1α</i>	rs11549467	rs11549465		

<i>TFBS (sitios de unión de factores de transcripción)</i>	rs2232079	rs10025845
<i>Enhancers</i>	rs2472632	rs17358295

Tabla 3. SNPs implicados en el riesgo de padecer ADP publicados en la literatura. Adaptado de Zhuo-Miao, Aging 2020 y Unal, Human Genomics 2024. https://www.ebi.ac.uk/gwas/efotraits/EFO_0002618

1.8.3 ESTUDIOS DE GENES CANDIDATO: RESULTADOS DESTACADOS

Los estudios de genes candidato representan una estrategia fundamental en la investigación genética, enfocada en la identificación y caracterización de genes específicos que se sospecha están asociados con ciertas enfermedades, rasgos fenotípicos o procesos biológicos. Este enfoque implica la selección de genes basados en conocimientos previos sobre su función biológica o su posible implicación en la enfermedad estudiada. A través de una variedad de técnicas genéticas y moleculares, estos genes se examinan minuciosamente en poblaciones humanas o modelos biológicos para determinar su contribución a los fenotipos observados. Las regiones genéticas que con más frecuencia se han estudiado para entender la predisposición al ADP incluyen aquellas relacionadas con la obesidad (45), la diabetes(46), el metabolismo de tóxicos como el alcohol y otros carcinógenos (47), el metabolismo de la insulina (48) y de la vitamina D (49). No obstante, existen líneas de investigación que están estudiado genes implicados en numerosas otras vías, como la angiogénesis, la reparación tisular o la autofagia (41,50).

La mayoría de los estudios en genes candidato publicados hasta la fecha tienen poca potencia estadística para detectar asociaciones, generalmente debido al reducido tamaño de la población de estudio, y a que, cuando se encuentran, en pocas ocasiones se realizan estudios de validación en poblaciones independientes.

En ADP, entre los genes más recientemente analizados, podemos destacar:

- *TAS1R2*, implicado en el receptor del gusto, cuya variante rs11261087 se asocia con una disminución del riesgo de padecer ADP (51)
- *NOC2L*, implicado en la organización de la estructura del nucleolo y en la génesis ribosomal, en el que la variante rs13303010 se ha asociado con riesgo aumentado de ADP en varias poblaciones diferentes (52)
- *URAD*, implicado en la regulación de la función de los peroxisomas y cuya variante rs9581957 presenta una relación estadísticamente significativa con el riesgo de ADP (53)
- *ABCC2*, miembro de la subfamilia de casete de unión al ATP, con varios SNPs asociados con peor pronóstico en casos con estadios I (54).

1.8.4 ESTUDIOS DE GWAS

Frente a los estudios de genes candidato, los GWAS exploran todo el genoma en busca de asociaciones entre variantes genéticas y fenotipos específicos sin hacer suposiciones a priori sobre qué genes podrían estar involucrados en los procesos biológicos subyacentes que conducirían a dicho fenotipo. El número de SNPs evaluado en un GWAS puede alcanzar varios millones, por lo que son necesarios niveles de significación estadística muy potentes, generalmente $p < 5 \times 10^{-8}$. Esto hace que los tamaños muestrales necesarios sean muy grandes, por lo que es habitual su diseño en el contexto de consorcios multicéntricos e internacionales.

El primer GWAS llevado a cabo para evaluar el riesgo de ADP se realizó en 2009 mediante el consorcio PanScan y sirvió para establecer la asociación entre el grupo sanguíneo ABO y el riesgo de padecer ADP (12). Otros GWAS posteriores de este mismo consorcio establecieron otros SNPs localizados en los loci 1q32.1 y 5p15.33 asociados a

los genes *NR5A2* y *TERT*, así como 13q22.1, ubicado en una región no codificante del cromosoma (55) en 16q23.1 asociado al gen *BCAR1/CTRB*, en 13q12.2 asociado al gen *PDX1* y en 22q12.1 asociado al gen *ZNFR3* (56).

Varios GWAS realizados en población asiática han informado de nuevas zonas de interés, como 6p25.3, 12p11.21 en población japonesa (57) o 21q21.3 o 5p13.1 en población china (58). Sin embargo, estos hallazgos no se han podido replicar en la población europea cuando se analizaron en la población del consorcio PANDORA. Entre las posibles explicaciones de los autores, refieren que es posible que la distribución de las variantes sea tan diferente que no permita establecer asociaciones estadísticas por no alcanzar un número suficiente en alguna de ellas, siendo el caso más evidente la variante rs2255280, monomórfica en población caucásica; por diferencias en el patrón del desequilibrio por ligamiento, atribuyendo a una variante una asociación en una población que en realidad se asociaba a otra cercana situada en el cromosoma o, con mucha menos probabilidad, a exposiciones ambientales que modulen el riesgo de manera diferente en las dos poblaciones (59). Aunque la mayoría de los esfuerzos han ido enfocados a la búsqueda de SNPs en regiones del ADN codificante, ya que su impacto sobre la funcionalidad de la proteína es más fácil de identificar, la mayoría de los hallazgos se producen en regiones no codificante. En un GWAS reciente, se han explorado las regiones no codificantes del ADN, encontrando 4 SNP ubicados en regiones activadoras y en sitios de unión de factores de transcripción (60).

1.8.5 ALTERACIONES SOMÁTICAS

La mutación más frecuente en el ADN es en *KRAS*, un oncogen que codifica una GTPasa que funciona como regulador de la señalización celular a estímulos

extracelulares. La presencia de mutaciones en este gen conlleva la activación mantenida de la proteína lo que provoca la promoción de señales de proliferación celular de manera descontrolada. Se considera un evento inicial en el desarrollo del ADP y está presente en más del 90% de los casos, evidenciándose ya en lesiones precursoras no invasivas (61).

La pérdida de función de numerosos genes supresores de tumores puede verse en el ADP por diferentes mecanismos, ya sea por pérdida de heterocigosidad, delección en homocigosis o hipermetilación de promotores

- *CDKN2A* se encuentra inactivado en la mayoría de los casos de ADP. Codifica varias proteínas por splicing alternativo, una de las cuales es p16. p16 actúa como un *inhibidor* de las quinasas dependientes del ciclo celular, en concreto *CDK4* y *6*, las cuales son esenciales para el avance del ciclo celular. La pérdida de la función de p16 anula un importante punto de control del ciclo celular y favorece la proliferación. (62-63)
- *TP53* es uno de los genes más frecuentemente alterados en cáncer, incluido el ADP. Está inactivado en más del 75% de los casos y conlleva la disminución del control de la proliferación celular y la pérdida de la señal de apoptosis en respuesta al daño sobre el ADN. (50)
- *SMAD4* se encuentra inactivado en aproximadamente la mitad de los casos de ADP. Se encarga de regular la expresión de genes en respuesta a *TGFβ*, el cual está implicado en el control del ciclo celular, la diferenciación, la apoptosis y la regulación del desarrollo embrionario (50).

1.8.6 HEREDABILIDAD DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

El riesgo de padecer ADP puede verse aumentado en el contexto de numerosos síndromes hereditarios, aunque se estima que alrededor del 10% de los casos van a estar causados por mutaciones a nivel germinal. (62)

Es conocido que los familiares directos de pacientes de ADP tienen un riesgo 4,5 veces mayor de padecer la enfermedad que la población sana, los que tienen 2 familiares directos un riesgo 6,5 mayor y los que tienen 3 familiares, hasta 32 veces (63,64).

Son múltiples los síndromes hereditarios de predisposición al CP:

- **Pancreatitis hereditaria:** la causa más habitual es la mutación en el gen *PRSS1*, aunque existen otros genes asociados a esta entidad como *SPINK1*, *PRSS2* o *CTRC*. Presenta un patrón de herencia autosómico dominante. Estos pacientes presentan episodios recurrentes de pancreatitis aguda en edad temprana (<25 años) que derivan en pancreatitis crónica y posteriormente, en un 18-53% de los casos, en ADP (65).
- **Síndrome de Peutz-Jeghers:** es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por la mutación en el gen *STK11*. Se caracteriza por la aparición de máculas pigmentadas en labios, mucosa oral, nariz, ojos o genitales y aparición de pólipos hamartomatosos en el tubo digestivo. Se asocia a un riesgo elevado de tumores digestivos, siendo el riesgo de padecer ADP entre 76 y 132 veces mayor que en la población sana. (62)
- **Síndrome de melanoma familiar con lunares atípicos múltiples:** es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por mutaciones en los genes *CDKN2A* o *CDK4*. Además de múltiples nevus cutáneos, se asocia a un

riesgo muy elevado de melanoma y de ADP, entre 12 y 36 veces respecto de la población sana (62).

- **Síndrome de Lynch:** causado por mutaciones en los genes de la vía de reparación de errores en el emparejamiento de bases: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* y *EPCAM*. Tiene una herencia autosómica dominante. Cada uno de ellos se asocia a un espectro fenotípico diferente, caracterizado por el aumento variable del riesgo de varios tipos de cáncer, como el de colon, endometrio, gástrico, vía biliar, urotelial, cerebral, tumores sebáceos y también, del ADP. El mayor riesgo lo confieren las mutaciones en *MLH1* con un aumento del riesgo de padecer ADP de hasta 8 veces (66).
- **Síndrome de Li-Fraumeni:** causado por mutaciones en el gen *p53* con un patrón de herencia autosómico dominante. Alrededor del 50% de estos pacientes desarrollarán cáncer antes de los 30 años, con un espectro fenotípico muy amplio. Presentan un riesgo muy elevado de cáncer de mama, sarcomas, tumores cerebrales, carcinomas adrenocorticales y tumores hematológicos. Se ha publicado un riesgo aumentado de ADP 7 veces mayor al de la población sana (67).
- ***BRCA2* y *PALB2*:** estos dos genes están implicados en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. Condicionan un aumento del riesgo de cáncer de mama, ovario, próstata y melanoma, además de ADP. *BRCA2* confiere un aumento del riesgo de entre 3 y 10 veces superior al de la población general, mientras que el asociado a *PALB2* está en torno a 4 (63).
- ***ATM*:** asociado al síndrome de ataxia-telangiectasia en homocigosis, los portadores en heterocigosis presentan un mayor riesgo de cáncer de mama y de

ADP. Se ha estimado un aumento del riesgo en torno a 6 veces superior al de la población general (68).

Aunque no hay uniformidad en los criterios de selección de los pacientes afectos de ADP candidatos a estudio genético, ya sea germinal o somático, existe una tendencia a estudiar cada vez a un porcentaje mayor de pacientes, independientemente de los antecedentes familiares o personales de cáncer. En aquellos casos en los que se realice el estudio a nivel somático, se estima que, aproximadamente, el 50% de los mismos va a tener correlato germinal, lo cual, va a tener implicaciones heredofamiliares. No se han publicado diferencias en el comportamiento biológico en aquellos casos portadores de mutaciones a nivel germinal frente a los que lo son exclusivamente a nivel somático.

1.9 LA VÍA DE LA AUTOFAGIA

1.9.1 EL PROCESO DE LA AUTOFAGIA

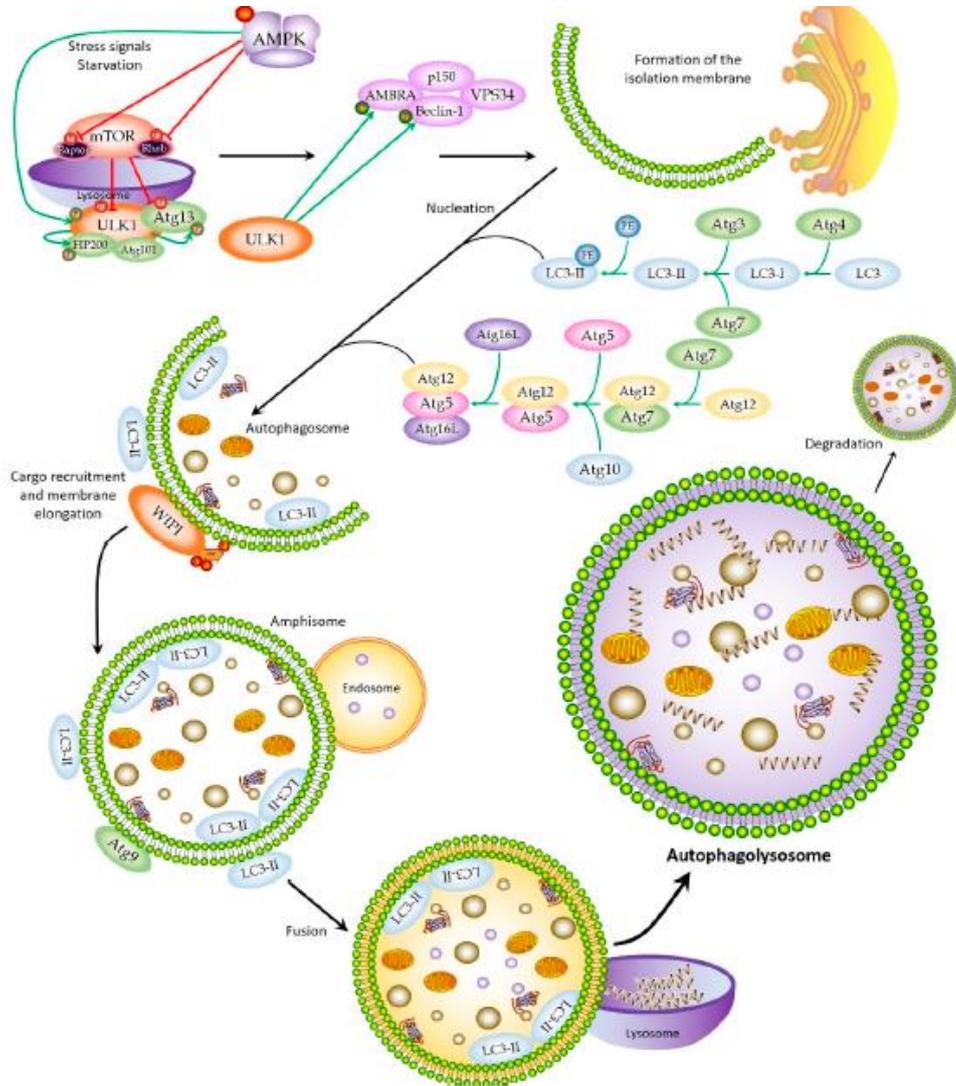
La autofagia es un proceso celular que tiene un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis intracelular y la supervivencia de las células. El término "autofagia" proviene del griego y significa "comerse a sí mismo", lo que refleja su función principal: la degradación y reciclaje de componentes celulares dañados o envejecidos para mantener la integridad de la célula. Este proceso es esencial para garantizar la supervivencia celular durante condiciones de estrés, como la privación de nutrientes, y desempeña un papel crucial en la prevención de enfermedades como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y las infecciones (69).

Es un proceso altamente conservado evolutivamente en las células eucariotas que se encarga de degradar hidratos de carbono, proteínas y lípidos para disponer de una mayor cantidad de nutrientes que permita la supervivencia celular en condiciones de ayuno. Pero, también es un mecanismo fundamental en el mantenimiento de la homeostasis al eliminar agregados proteicos y organelas disfuncionales que pueden comprometer el funcionamiento de la célula, además de intervenir en la diferenciación celular y la remodelación tisular.

Es un mecanismo que puede ser no selectivo y actuar sobre cualquier elemento del citoplasma de la célula o ser específico de algún componente, proceso que va a estar mediado por señales específicas reconocidas por receptores autofágicos (70).

La autofagia puede llevarse a cabo de tres maneras: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA). En las dos primeras, la diferencia radica en el tamaño de la vesícula formada por estructuras de membrana celular donde se va a producir la descomposición de los elementos celulares, el autofagosoma, mientras que, en la CMA, directamente se dirigen las estructuras marcadas hacia los lisosomas para su degradación. Del proceso de investigación en el campo de la autofagia se han identificado más de 40 genes los cuales se han agrupado bajo el término de genes relacionados con la autofagia (ATG). El proceso de la autofagia va a estar regulado por los ATG en sus diferentes procesos, los cuales pueden resumirse en tres pasos: la iniciación, la generación del autofagosoma y la fusión de este con los lisosomas (71). La iniciación del proceso de la autofagia se produce cuando una situación de estrés nutricional o lesión celular provoca la inhibición de mTOR a través del complejo *mTORC1*. Este hecho desencadena el reclutamiento de múltiples proteínas como el complejo *ULK*, formado por *ULK1*, *ATG13*, *FIP200* y *ATG101*. En este punto, es preciso

que se inicie un proceso de reclutamiento de membranas celulares para comenzar la elaboración de una estructura que almacene aquellos elementos que van a ser degradados



para el reciclado de sus componentes (72).

Figura 4. Esquema de la vía de la autofagia. Adaptado de García-Ruiz O, Cancers 2022.

Para ello, *DFCPI* es una proteína que se encarga de marcar elementos nucleares, principalmente del retículo endoplásmico, aunque no exclusivamente, con PI3P. Estas estructuras se conocen como omegasomas y son el principal aporte de elementos de membrana para la formación del fagóforo. La producción de PI3P se posibilita por el

fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), la cual va a estar regulada por el complejo de clase III de PI3K, formada por las proteínas *VPS34*, *Beclin1* y *ATG14* (71,73–75).

La localización en la célula de este proceso se produce gracias a que *ATG13* es capaz de atraer al complejo de clase III de PI3K. Una vez que están reclutados todos los elementos, es preciso que el omegasoma se expanda para englobar los elementos celulares que van a ser incluidos en el fagóforo, proceso denominado nucleación. Este proceso está dirigido por el complejo de clase III de PI3K, el cual va a ir incorporando fosfolípidos consiguiendo la elongación del omegasoma, además de por otros elementos como *DFCPI* y las proteínas WIPI, las cuales son capaces de interactuar con PI3P para regular este proceso. Adicionalmente, *ATG12* se va a conjugar con *ATG5* y posteriormente, con *ATG16L* para formar un complejo que en coordinación con *ULK* y *WIPI* regula la elongación del fagóforo, junto a otras proteínas como *ATG2* y *ATG9* (71,73,75)

Para conseguir una estructura cerrada, además de este complejo, es preciso la interacción con LC3. Esta proteína se sintetiza a través de una proteína precursora, proLC3, que, a través de la acción de *ATG4*, se convierte en su forma soluble, LC3-I. Posteriormente, esta forma se conjuga con fosfatidiletanolamina para formar LC3-II mediante la acción de *ATG7* y *ATG3*. Es esta forma conjugada la que se asocia con la membrana del fagóforo, la cual se distribuye de manera dinámica por toda la membrana, al igual que el complejo *ATG12-ATG5-ATG16L*, permitiendo una acción coordinada que contribuye al cierre dinámico y coordinado de las membranas y la culminación del fagóforo, ya denominado autofagosoma (71,73).

El siguiente paso es la fusión del autofagosoma con el lisosoma para iniciar la autofagia. Los autofagosomas pueden distribuirse por todo el citoplasma, pero los lisosomas son predominantemente perinucleares, por lo que es preciso que ambas

estructuras se acerquen para su fusión. Proteínas como la dineína o la miosina colaboran en el movimiento de los autofagosomas por los microtúbulos para acercarlos a los lisosomas. En este proceso, es posible que se fusionen con endosomas, cuyo aporte puede modificar la composición del autofagosoma, formando una estructura denominada anfisoma. Una vez se encuentran cerca, varios elementos median en la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma (71,73,74). Para que se produzca la fusión de membranas, es necesaria la participación coordinada entre las proteínas SNARE, las GTPasas de la familia *Rab* y diversos factores de anclaje. Las proteínas SNARE se encuentran en ambas membranas y su unión está regulada espaciotemporalmente por numerosos factores. Forman dos complejos: *STX17*, *SNAP29* y *VAMP8* por un lado y por otro, *YKT6*, *SNAP29* y *STX7*, los cuales funcionan en paralelo. *ATG14* interacciona con *STX17* y permite el anclaje a la membrana del autofagosoma y su estabilización. Las proteínas *Rab* van ciclando entre la forma activa asociada a GTP y la forma inactiva asociada a GDP. Se encargan de reclutar a los diferentes factores de anclaje para permitir la fusión de membranas. Para ello, las proteínas han de ser preniladas, lo que permite su unión a las membranas celulares y ejercer su función. La prenilación es un proceso de modificación post traduccional de las proteínas que implica la adición de un grupo hidrofóbico tipo prenilo a los residuos de cisteína de la proteína, lo que la hace más soluble y permite su fusión en la membrana (75).

Los elementos de anclaje incluyen multitud de proteínas, como *EPG5*, el complejo *HOPS* o *PLEKHM1*. Estos elementos se unen simultáneamente a *ATG8* en la membrana del autofagosoma y a *Rab7* en la membrana del lisosoma para que ambos elementos queden unidos. La proteína *GRASP55* complementa esta función al unirse a *ATG8* en el

autofagosoma y a *LAMP2* en el lisosoma, además de *BRUCE*, mediante su unión a *ATG8* y a *STX11* (71,75).

La coordinación de todos estos procesos permite la captura de las vesículas del citosol, la puesta en contacto y la estabilización del ensamblaje mediante el complejo SNARE. Los elementos de anclaje, coordinados por las proteínas *Rab*, contribuyen a la fusión de membranas y la maduración del autofagosoma al unir los elementos a procesar con el contenido del lisosoma para su auto digestión.

1.9.2 AUTOFAGIA Y CÁNCER

La capacidad de la autofagia de reciclar organelas dañadas o eliminar agregados celulares que pueden resultar tóxicos es un punto que puede tener gran interés en el tratamiento de diversas enfermedades como las neurodegenerativas. Una mala función de los mecanismos de autofagia puede hacer que algunas funciones celulares se vean alteradas, que disminuya la capacidad de resistencia frente a ciertos patógenos, que se acumulen especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales conllevan daños en el ADN o que se altere la adecuada presentación de antígenos, todos ellos procesos relacionados con la transformación maligna de las células (76,77).

Se han descrito funciones más allá de las relacionadas con la autofagia para las proteínas *ATG*. En situaciones de estrés, como en lesiones del ADN o de escasez de nutrientes, *p53*, proteína relacionada con la regulación del ciclo celular, puede trasladarse al citoplasma e interactuar con múltiples factores para modular el proceso de la autofagia. A niveles basales, *p53* actúa como represor de la autofagia, pero, a niveles elevados es capaz de activar múltiples genes como *ATG7*, *DRAM1* o *PRKAB1* que son capaces de inducir el proceso autofágico. Del mismo modo, *ATG7* es capaz de reprimir la activación

de *p53* lo que sugiere que esta regulación recíproca va a estar relacionada con la situación de estrés que, en ese momento, sufra la célula. La desregulación del ciclo celular a nivel de *p53* se ha asociado con la tumorigénesis y con la progresión tumoral. En numerosos tipos tumorales se han evidenciado mutaciones y disminución de la expresión de varias proteínas *ATG*, lo que sugiere que la evasión de los mecanismos de la autofagia supone una ventaja para las células tumorales (76,78)

La regulación de las ROS es otro mecanismo por el que la autofagia participa de la supresión tumoral. El mecanismo más importante y uno de los mejores estudiados es la mitofagia, un proceso de autofagia selectiva contra las mitocondrias. La activación de *PINK1* en la membrana mitocondrial recluta a la proteína *Parkina*, la cual induce la ubiquitinización de la membrana mitocondrial, uno de los principales mecanismos de marcado de estructuras para la autofagia selectiva (79). Está descrita la alteración de la expresión de ambas proteínas en numerosos tipos tumorales, así como en modelos murinos knock out para los genes *PARK6* y *PARK2*, responsables respectivamente de la expresión de *PINK1* y *Parkina*; lo que sugiere su papel como supresoras de tumores (79,80). La acumulación de mitocondrias disfuncionales en el citoplasma celular va a resultar en una acumulación de ROS y se ha asociado con una mayor tasa mutacional y como un hecho conductor en la agresividad tumoral en modelos celulares de ADP al favorecer un fenotipo propicio para la transición epitelio-mesénquima (EMT), capacidad invasiva y aparición de metástasis a distancia, el cual era corregido al administrar N-acetilcisteína (81). En esta línea, también actúa la pexofagia, otro mecanismo de autofagia selectiva contra los peroxisomas, la cual, aunque se conoce que tiene un papel importante en el mantenimiento de las ROS, su papel en el desarrollo tumoral es desconocido (76).

Otra manera de conseguir una autofagia selectiva es mediante *p62*, una proteína que funciona como adaptador de reconocimiento de cargo (ACR, de sus siglas en inglés). Se encarga de identificar proteínas dañadas, organelas no funcionales y agregados citosólicos que puedan ser lesivos para la célula. La acumulación de ACR, especialmente *p62*, se ha asociado con un fenotipo más agresivo y con resistencia terapéutica en modelos celulares deficientes en la vía de la autofagia, principalmente mediando la activación de la vía NFκB. La acumulación de *NBR1*, un ACR relacionado con *p62*, genera efectos similares en modelos animales y promueve el desarrollo de metástasis y de fenotipos agresivos (82).

Además de las células tumorales, la autofagia juega un papel importante modulando los fibroblastos asociados al cáncer (CAF), los principales responsables de la desmoplasia tumoral. La desmoplasia tumoral hace referencia a un estroma fibroso y denso generalmente asociado a un entorno inflamatorio, caracterizado por la activación de los fibroblastos y el depósito de colágeno. Se ha asociado con resistencia a la quimioterapia al tener una menor difusión de los citostáticos en el tejido tumoral. El déficit de la autofagia de las CAF se ha implicado en un defecto en el equilibrio y la génesis del colágeno, lo que resulta en una disminución de su depósito, un estroma menos rígido y una menor secreción de citoquinas proinflamatorias y factores proangiogénicos que se han asociado con un mejor pronóstico en algunos tipos tumorales, como el ADP (83).

Las ATG son capaces de regular la secreción de vesículas extracelulares tanto por vías relacionadas con la autofagia como por vías independientes. Este hecho es usado por las células tumorales para obtener factores de crecimiento que pueden influir en el proceso metastásico. Son numerosas las ATG relacionadas con procesos independientes de la

autofagia que pueden influir en la señalización celular, la respuesta inmunológica, el ciclo celular y los procesos de muerte celular inducida, los cuales están siendo investigados como biomarcadores y dianas terapéuticas en diversos escenarios (76,84,85).

1.9.3 AUTOFAGIA Y CÁNCER DE PÁNCREAS

La autofagia juega un papel fundamental en el ADP. En la mayor parte de los casos está asociada con la mutación en *KRAS* como agente iniciador. En modelos murinos con mutación en *KRAS* se aprecia un aumento de PanIN, las cuales acaban evolucionando a ADP. Sin embargo, en modelos knockout para *ATG5* o *ATG7*, esta transformación a ADP desde PanIN no se aprecia, lo que sugiere que el desarrollo de la mayor parte de los casos de ADP requiere de la participación de la autofagia (86).

La participación de la autofagia en el proceso de tumorigénesis en el ADP no se limita a este punto, sino que se han descrito numerosas interacciones entre diferentes componentes del proceso autofágico y del desarrollo, promoción y diseminación del ADP.

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso fundamental en la diseminación metastásica por el que células epiteliales adquieren características mesenquimales que le permiten la movilización y su diseminación por el sistema circulatorio. La autofagia y la EMT van a estar estrechamente relacionadas. Por un lado, porque la autofagia permite poner a disposición de la célula tumoral los nutrientes necesarios para el proceso y por otro, porque regula a la baja determinados factores críticos en el control del ciclo celular (87). En ADP, niveles elevados de *TGF β 1*, un inductor conocido de EMT, se asocian con un aumento de la conversión de LC3-I a LC3-

II y de la formación de autolisosomas. En tumores con expresión de *SMAD4*, *TGFβ1* promueve la proliferación y frena la migración celular al regular a la baja su translocación nuclear. Sin embargo, en tumores negativos para *SMAD4*, el *TGFβ1* tiene un efecto contrario, frenando la proliferación y favoreciendo la migración a través de la vía MAPK/ERK. Por lo tanto, *TGFβ1* va a ser capaz de contribuir a diferentes patrones de comportamiento del ADP en función del genotipo, por lo que se postula como una diana terapéutica personalizada en el tratamiento del ADP (88).

No obstante, la relación que en el ADP tienen la EMT y la autofagia es mucho más compleja, puesto que su regulación no siempre se va a encontrar en la misma dirección, lo que puede resultar en que la inhibición de la autofagia conlleve la promoción de la EMT. En modelos celulares de CP con mutación en *KRAS*, la depleción de *ATG3* o *ATG5* se asocia con la sobreexpresión de *ZEB1* y *Snail2*, los cuales son inductores de la EMT mediante la activación de la vía del NFκB, la cual se postula que es un paso crucial en la adquisición del fenotipo mesenquimal. Adicionalmente, la depleción de *p62* en estos modelos se asocia a la pérdida de la activación de la vía del NFκB y el bloqueo de la adquisición de este fenotipo. En el caso concreto del ADP, la acumulación de *p62* como resultado de la inhibición de la autofagia se asocia con la activación de la vía del NFκB y la promoción del EMT y, adicionalmente, con la disminución de los niveles de expresión de *CDH1*, lo que podría ser utilizado como biomarcador (89). La modulación de la autofagia no solo influye en la EMT, sino que también puede afectar a otros mecanismos moleculares en el ADP. Actúa selectivamente, por ejemplo, conduciendo a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (CMH-I) hacia los lisosomas, provocando así una menor expresión en la membrana celular y dificultando la respuesta inmune sobre las células tumorales. El ADP se ha mostrado especialmente resistente al tratamiento con inhibidor es de los puntos de control inmune. Pues bien, en modelos

tumorales en los que se bloquea la autofagia con cloroquina, se ha constatado una potente respuesta al doble bloqueo con anti-PDL1 y anti-CTLA4, además de apreciarse una mayor infiltración de linfocitos T CD8 y una menor infiltración de células mieloides supresoras, algo especialmente relevante al considerarse que el ADP es un tumor frío con escasa infiltración linfocitaria (90).

1.9.4 AUTOFAGIA COMO DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE PÁNCREAS

En base a toda la evidencia presentada, parece razonable sugerir que la autofagia pueda constituir una diana para el tratamiento del ADP. En modelos murinos, la presencia de diferentes fármacos con capacidad para inhibir la autofagia como wortmanina cloroquina o hidroxiclороquina se asocian con una mayor sensibilidad a quimioterapia y radioterapia en diferentes líneas celulares de tumores humanos implantados (91).

No obstante, la modulación farmacológica *in vivo* de la autofagia hoy en día dista mucho de ser superponible a la conseguida con la ablación genética en animales de laboratorio. La modulación farmacológica de la autofagia presenta diversas limitaciones, como puede ser la toxicidad, la falta de selectividad, las interacciones con otros fármacos o la dificultad para encontrar una correcta dosificación (92)

A pesar de todas las limitaciones, y dado que la autofagia juega un papel especialmente relevante en el ADP, se ha investigado si la administración de agentes moduladores de la autofagia puede ser útil en el tratamiento farmacológico del ADP. La cloroquina (CQ), un antipalúdico ampliamente usado a nivel mundial y su derivado, la

hidroxicloroquina (HCQ), son las sustancias más estudiadas en el tratamiento del ADP en diversos escenarios y combinaciones. Ambas sustancias actúan acumulándose en los lisosomas aumentando el pH intralisosomal, lo que inhibe la actividad de las enzimas lisosomales e impide la degradación del contenido intravesicular. Este hecho también impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma e implica la acumulación de los autofagosomas no degradados (93).

Se han diseñado estudios en fase II destinados a evaluar si se elevaban los niveles de LC3-II en linfocitos periféricos tras la administración de HCQ en pacientes con ADP tal y como se observó en ratones. Uno de estos estudios mostró niveles heterogéneos en los diferentes pacientes, lo que no permitió establecer el papel de LC3-II como biomarcador de la inhibición de la autofagia. Además, se observó una tasa de control de la enfermedad a los 2 meses de tan solo el 10%. Aunque es posible que los niveles de HCQ no fueran suficientes y que se incluyera en el estudio a pacientes tratados con múltiples fármacos, el empleo de HCQ en monoterapia en el tratamiento del ADP se abandonó a raíz de estos resultados (94)

El primer estudio de combinación de CQ con gemcitabina que se desarrolló en pacientes metastásicos mostró un perfil de toxicidad manejable y una tasa de respuestas objetivas del 33%. No obstante, no se apreciaron cambios en la SLP (4 meses) o en la SG (7,6 meses) respecto a lo esperable con gemcitabina. La dosis máxima de CQ fue de 300 mg semanales para evitar la toxicidad retiniana y la inmunosupresión (95)

No obstante, la monoterapia con gemcitabina no es un estándar en el tratamiento de primera línea en los pacientes con buen estado general, los cuales van a recibir tratamiento con poliquimioterapia. En un estudio fase II randomizado promovido por las universidades de Pennsylvania y la John Hopkins se evaluó el papel de la adición de HCQ

a dosis de 600 mg dos veces al día al esquema de gemcitabina y nab-paclitaxel. El objetivo principal del estudio fue la tasa de SG a 1 año. No se observaron diferencias en SG ni en SLP entre el grupo que recibió tratamiento con HCQ y el grupo control. Sin embargo, sí que se apreció un aumento estadísticamente significativo de la tasa de respuestas a favor del brazo con HCQ (38,2% vs 21,1%) así como una mayor toxicidad en forma de neutropenia, náuseas, neuropatía periférica y alteraciones visuales. Los autores concluyen que, aunque no se observó un aumento en supervivencia, el aumento en la tasa de respuestas hacía que la adición de HCQ podría ser interesante en enfermedad localmente avanzada (96).

En la enfermedad localizada, la adición de HCQ a gemcitabina se asoció con una elevada tasa de resección R0 (77%) y una mediana de SG de 34,8 meses. En aquellos casos en los que se aprecia un aumento de LC3-II en linfocitos circulantes se asoció a un aumento significativo en SLP (15 vs 6,9 meses) y en SG (34,8 vs 10,8 meses). No obstante, el bajo número de pacientes incluidos (N=35) únicamente permite establecer este punto como generador de hipótesis para estudios futuros (97).

En un intento de mejorar estos resultados, el mismo grupo diseña un estudio fase II randomizado de combinación de dosis altas de HCQ en combinación con el esquema preoperatorio de gemcitabina y nab-paclitaxel. En este ensayo, el objetivo principal fue la tasa de respuesta patológica en la pieza quirúrgica, medido mediante el sistema de puntuación de Evans. El brazo de pacientes que recibió terapia de combinación tuvo un 20,6% de casos con una tasa de necrosis superior al 90% frente al 0% del brazo con quimioterapia sola, así como un 56% de casos con necrosis >50% frente a un 10% de casos en el brazo de quimioterapia sola. En población global, el análisis acumulativo

mostró un beneficio estadísticamente significativo de la combinación con HCQ frente a la quimioterapia en cuanto a tasa de respuesta. No obstante, aunque se apreciaron diferencias numéricas a favor del brazo de combinación (36 vs. 32 meses), no resultaron estadísticamente significativas, aunque el ensayo no estaba potenciado para detectar diferencias (98).

A la vista de los resultados, se siguen realizando estudios para buscar el máximo potencial a esta maniobra, ya sea con nuevas combinaciones o en diferentes escenarios. Recientemente, se han descrito los resultados de la combinación de trametinib, un inhibidor de MEK, y HCQ en pacientes con mutaciones en *KRAS* en tercera línea o posteriores. Aunque el número de pacientes fue muy reducido (N=8), no se observaron signos de beneficio para la combinación, aunque los autores consideran que es necesario extender la cohorte en líneas más tempranas antes de poder descartar definitivamente la combinación (99).

2. JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de páncreas es una enfermedad extremadamente compleja y con una tasa de mortalidad elevada, siendo una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial. A pesar de los avances en los tratamientos oncológicos, la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas sigue siendo alarmantemente baja, con una tasa de supervivencia a cinco años que no supera el 10%. Esta situación se debe a su diagnóstico tardío, cuando la enfermedad ya se encuentra en estadios avanzados, y a la limitada eficacia de los tratamientos disponibles. Además, el cáncer de páncreas presenta una notable heterogeneidad clínica y molecular, lo que hace que su manejo y tratamiento sean especialmente difíciles.

El interés científico en el cáncer de páncreas ha aumentado en los últimos años, reflejado en la gran cantidad de estudios publicados sobre la patología. En una búsqueda reciente en la base de datos PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando el término "pancreatic cancer", se encontraron más de 150,154 publicaciones, de las cuales 10,839 fueron publicadas en el último año (2024). A pesar de la cantidad de investigaciones, los mecanismos moleculares subyacentes del cáncer de páncreas no **se conocen** completamente y la identificación de biomarcadores y nuevas dianas terapéuticas sigue siendo un desafío importante.

Uno de los aspectos más relevantes en la investigación de este cáncer es la falta de diagnóstico temprano, lo que resalta la necesidad urgente de nuevos enfoques para la detección precoz, así como de tratamientos más efectivos. En este contexto, el cáncer de páncreas ha demostrado ser una enfermedad multifactorial en la que intervienen factores genéticos, epigenéticos y ambientales. A pesar de los esfuerzos, los tratamientos actuales son limitados, y la tasa de respuesta a las terapias convencionales sigue siendo baja.

Nuestro grupo de investigación **participa** el consorcio internacional PANDORA, cuyo objetivo es identificar y validar marcadores genéticos asociados al cáncer de páncreas. A través de estudios genéticos de gran escala y análisis de cohortes internacionales, el consorcio

PANDORA busca comprender mejor la biología molecular de esta enfermedad y la influencia de variaciones genéticas sobre la progresión tumoral y la respuesta terapéutica. Además, se está investigando la participación de rutas moleculares críticas, como la autofagia y la reparación del ADN, que juegan un papel fundamental en la supervivencia celular, la resistencia a la quimioterapia y la metástasis en este tipo de cáncer.

Basándonos en descubrimientos recientes que sugieren que la alteración de la autofagia puede tener un impacto significativo en el desarrollo y progresión del cáncer de páncreas, nuestro consorcio se enfoca en el estudio de la variación genética en esta vía. Investigaciones previas en **otros tumores sólidos e incluso hemopatías malignas** han revelado que los defectos en la regulación de la autofagia están relacionados con la resistencia a tratamientos y la agresividad del tumor. De esta manera, el consorcio **PANDORA** busca extender este enfoque al cáncer de páncreas, realizando un análisis exhaustivo de las variantes genéticas asociadas a la autofagia y su impacto sobre la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.

El consorcio está llevando a cabo estos estudios en colaboración con diversos centros de investigación y hospitales internacionales, lo que permitirá una mayor diversidad genética en las cohortes analizadas. Asimismo, se están implementando modelos funcionales *in vitro* e *in silico* para validar las variantes genéticas identificadas y estudiar sus efectos sobre los procesos biológicos clave en el cáncer de páncreas. Con el avance de este proyecto, esperamos contribuir significativamente al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas personalizadas y mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes afectados por esta devastadora enfermedad.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la generación de conocimiento acerca de la influencia de la vía de la autofagia en la evolución del ADP, dada la evidencia publicada hasta la fecha de su papel como factor predisponente, predictivo y pronóstico, así como potencialmente accionable a diferentes niveles terapéuticos.

Los objetivos específicos son:

- Seleccionar todos los SNPs de los genes relacionados con autofagia candidatos a ser incluidos en este estudio.
- Extraer de varios estudios de GWAS en ADP previamente publicados y desarrollados por los consorcios PANScan I-III, PANC4 y FinnGen todos los SNPs que se asocian significativamente con el riesgo a desarrollar ADP con un nivel de significación de $p < 1,72 \times 10^{-5}$
- Validar las asociaciones más relevantes mediante un metaanálisis con las cohortes independientes del consorcio (PANDoRA).
- Analizar el impacto funcional de aquellas variantes consideradas de potencial interés utilizando datos de “*Human Functional Genomic Project*” (HFGP) que incluyen datos de la cuantificación de 9 citoquinas tras diferentes ensayos de estimulación en muestras de sangre, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y macrófagos derivados de monocitos (MDM). Además, el HFGP incluye datos del conteo de 91 poblaciones celulares de sangre periférica (en valores absolutos) y de los niveles de 103 proteínas inflamatorias y 7 hormonas esteroideas en suero y plasma.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Selección de pacientes

La población de estudio comprendió 15.776 casos de ADP procedentes de GWAS realizados en las poblaciones PanScan I-III de ADP (55,56) y la población del consorcio PanC4 (100). En todos estos estudios, los casos de ADP presentaron un diagnóstico histológico confirmado de la enfermedad y los controles eran donantes de sangre sanos o personas escogidas al azar entre la población general y sin historia de enfermedad oncológica. Todas las instituciones participantes obtuvieron la aprobación de los comités de ética a nivel local y todos los participantes incluidos en los estudios mencionados firmaron el correspondiente consentimiento informado. Posteriormente, se incluyeron también casos del grupo finés FinnGen, el cual aglutina muestras de los biobancos de Finlandia pareados con los datos de la historia clínica digital de los registros del Sistema Nacional de Salud (<https://www.finnngen.fi/en>). Este hecho permitió la incorporación de 1.249 casos adicionales y 259.583 controles.

4.2 Elección de los SNPs y metaanálisis de cohortes

Se seleccionaron 234 genes relacionados con la autofagia recogidos en la base de datos de autofagia (<http://autophagy.lu/index.html>) así como 55.583 SNPs incluidos en estos genes o en posiciones cercanas definidas como 5 kb por encima o 3 kb por debajo del gen en cuestión recogidos en las cohortes PanScan I, II y III, así como en la población del consorcio PanC4. Se incluyen solo variantes con un valor de imputación superior a 0.8 analizados mediante el software IMPUTE2 v.2.3 (101), así como otros controles de

calidad destinados a comprobaciones de omisión, duplicados, parentesco críptico, heterocigosidad anormal y valores atípicos mediante el software *Eigenstrat* (102).

A continuación, se llevó a cabo un metaanálisis de los GWAS de las poblaciones PanScan I-III, PanC4 con la población de FinnGen usando METAL (103). Para evaluar la heterogeneidad entre las cohortes se empleó el estadístico I^2 , y el metaanálisis se realizó siguiendo un modelo de efectos fijos que asume que el efecto de los marcadores genéticos será el mismo en todas las poblaciones analizadas.

Del total de las 55.583 variantes seleccionadas, 45.036 SNPs fueron comunes en las plataformas de genotipado de las diferentes cohortes y fueron incluidas en el metaanálisis. De ellas, 2.908 se consideraron independientes de acuerdo con los datos de LDLink en cohortes europeas, por lo que el nivel de significación para la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni se estableció en $1,71 \times 10^{-5}$ (0,05/2.908 SNPs).

4.3 Cohortes de replicación, genotipado y metaanálisis

Tras el metaanálisis de las 3 cohortes de GWAS, se seleccionaron las señales genéticas más interesantes y se validó su asociación en la población de replicación que incluyó 6.881 individuos, 3.226 casos y 3.665 controles. Para la selección de los marcadores que se validaron en la fase de replicación, se excluyeron aquellos SNPs que ya se habían identificado previamente como relacionados con la susceptibilidad al ADP y se seleccionan para su replicación en el consorcio PANDoRa (Figura 5) solo aquellos SNPs que representaron potenciales nuevas señales de asociación considerando un nivel de asociación de $p < 10^{-4}$. Al igual que en las poblaciones usadas en la fase de descubrimiento, se obtuvo la aprobación del comité de ética para cada una de las

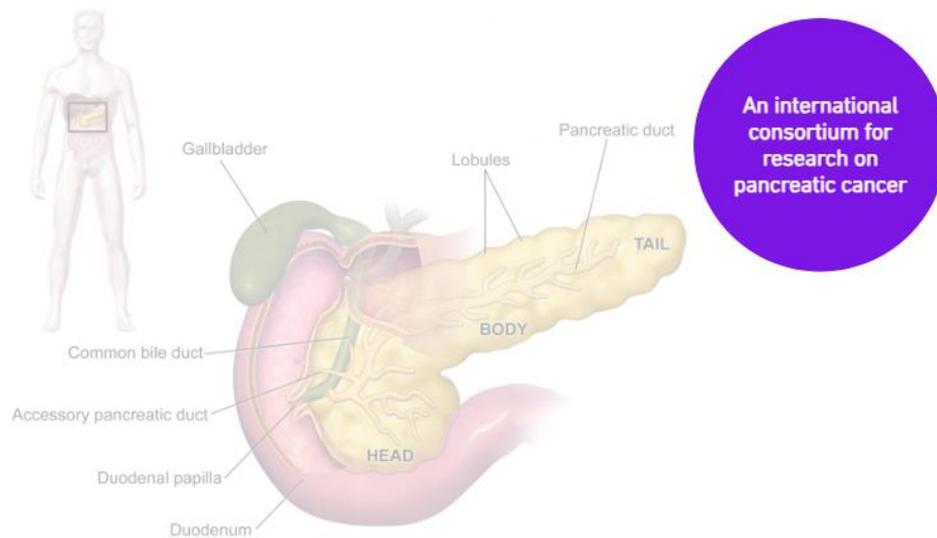
instituciones participantes en el consorcio PANDoRA y todos los participantes firmaron consentimiento informado para su inclusión en el estudio.

PANDoRA
The PANcreatic Disease ReseArch Consortium



Q Search Site

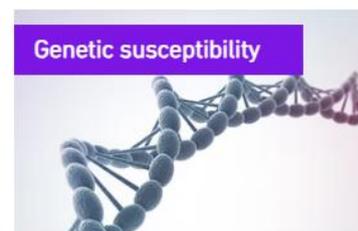
HOME AIMS PANDoRA MEMBERS RESEARCH CONSORTIUM CONTACT US



Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer deaths in the European Union and in the USA, with a five-year relative survival of less than 5% particularly for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most common form of the disease. There is no effective screening test for pancreatic cancer and metastatic disease is often present at initial diagnosis.



Established risk factors include cigarette smoking, obesity and overweight, a medical history of chronic pancreatitis or diabetes type II, and family history of pancreatic cancer.



A small proportion of pancreatic tumors arises as a result of high penetrance germline mutations, usually in the context of familial cancer syndromes. However, the very low frequency of those mutations cannot explain the bulk of genetic susceptibility to pancreatic cancer. In recent years, genome-wide and targeted gene/pathway association studies have started unraveling the genetic architecture of pancreatic cancer risk.

Identifying groups of people in the general population who are at increased risk of developing pancreatic cancer offers the best hope for early diagnosis and therefore for improved prognosis of this terrible disease. One possible strategy for identification of subjects at increased risk is to study genetic factors that affect susceptibility to pancreatic cancer. In this context we have established the Pancreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium.

Figura 5. Página web del consorcio PANDORA (<https://pandoraconsortium.wixsite.com/pandora>).

El genotipado de los SNPs se realizó en la Universidad de Pisa mediante KASPar® (LGC Genomics, Hoddesdon, UK) o Taqman® SNP Genotyping assays (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) de acuerdo con los protocolos especificados para cada técnica. Como control interno, alrededor del 5% de las muestras se seleccionaron aleatoriamente y se incluyeron por duplicado. La concordancia para las muestras duplicadas fue $\geq 99,0\%$. Un ejemplo de este procedimiento se representa en la Figura 6.

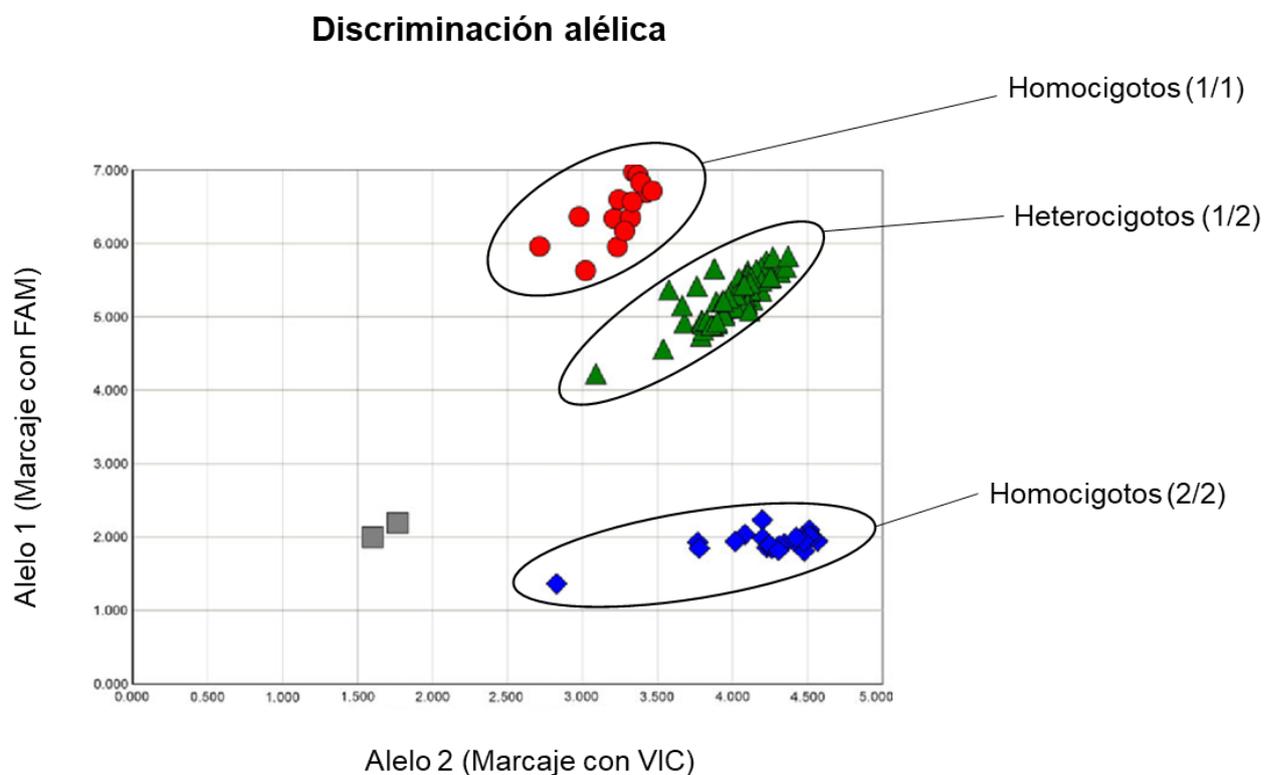


Figura 6. Gráfica típica de un análisis de genotipado con sondas KASP® o Taqman®.

Todos los SNPs tuvieron una frecuencia en la población control similar a la presente en la base de datos del *1000 Genomes*.

Tras el genotipado de los marcadores, se realizó un nuevo metaanálisis con las estimaciones de asociación obtenidas en PANDoRa y las publicadas en los consorcios

PanScan I-III, PANC4 y FinnGen mediante METAL (103). De nuevo se utilizó el modelo de efectos fijos y el estadístico I^2 para evaluar el grado de heterogeneidad de las poblaciones analizadas.

4.4 Efecto funcional de las variantes relacionadas con la autofagia

Para comprender mejor el papel funcional de los SNPs analizados en este estudio, realizamos experimentos de estimulación en la cohorte de 500 individuos del Human Functional Genomic Project (HFGP; <http://www.humanfunctionalgenomics.org/site/>). El estudio del HFGP fue aprobado por el Comité Ético de Arnhem-Nijmegen (n.º 42561.091.12) y las muestras biológicas se recolectaron tras obtener el consentimiento informado de cada sujeto participante. Investigamos si alguno de los SNPs que fueron validados exitosamente a través del metaanálisis de las poblaciones de estudio se correlacionaba con los niveles de 9 citocinas pro y antiinflamatorias (TNF α , IFN γ , IL1Ra, IL1 β , IL6, IL8, IL10, IL17 e IL22) tras la estimulación de sangre total, PBMCs o monocitos derivados de macrófagos (MDM) de 408 sujetos sanos. La estimulación se realizó con LPS (100 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis), PHA (10 μ g/ml, Sigma), Pam3Cys (10 μ g/ml, EMC microcollections), CpG (100 ng/ml, InvivoGen) durante 24 o 48 horas. Los protocolos detallados para la extracción de PBMCs, diferenciación de macrófagos y ensayos de estimulación han sido descritos en detalle en publicaciones previas (104).

Brevemente, las PBMCs se lavaron dos veces con solución salina y se resuspendieron en medio (RPMI 1640) suplementado con gentamicina (10 mg/mL), L-glutamina (10 mM) y piruvato (10 mM). Las estimulaciones de PBMCs se realizaron con

5×10^5 células por pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner) durante 24 horas en presencia de suero humano al 10% a 37 °C y 5% de CO₂. Tras la estimulación in vitro, los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis posterior en ensayos ELISA. Los experimentos de estimulación de sangre total se realizaron utilizando 100 µl de sangre heparinizada que se añadió a una placa de 48 pocillos y se estimuló con 400 µl de LPS, PHA (volumen final de 500 µl) y CpG durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -20°C hasta su uso en los ensayos ELISA.

Las concentraciones de TNF α , IFN γ , IL1Ra, IL1 β , IL6, IL8, IL10, IL17 e IL22 humanos se determinaron utilizando kits comerciales específicos de ELISA (PeliKine Compact, Ámsterdam, o R&D Systems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando los valores estaban por debajo o por encima del límite de detección del ELISA, se utilizó el límite correspondiente. Después de la transformación logarítmica de los datos de loci cuantitativos de citocinas (cQTL), se realizaron análisis de regresión lineal ajustados por edad y sexo para determinar la correlación de los SNPs con los cQTLs. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software R (<http://www.r-project.org/>), empleando scripts personalizados en el lenguaje de programación R basados en funciones existentes como lm (stats). Para tener en cuenta las comparaciones múltiples, utilizamos un umbral de significación de $2,92 \times 10^{-4}$ (Teniendo en cuenta los SNPs independientes significativos, las citocinas testadas y los estimulantes utilizados).

4.5 Correlación de los SNPs identificados con los recuentos de células sanguíneas y los perfiles proteómicos séricos/plasmáticos

Para evaluar el impacto de los SNP seleccionados en la variación de las frecuencias de las células inmunitarias, se midieron 91 poblaciones de células derivadas

de la sangre mediante citometría de flujo de 10 colores (citómetro de flujo Navios, Beckman Coulter, Miami, FL, USA) tras la toma de muestras de sangre (2-3 horas) y se realizó un análisis del recuento celular utilizando el software Kaluza (Beckman Coulter, v.1.3). Con el fin de reducir el ruido inter-experimental y aumentar la potencia estadística, se realizó un análisis del recuento celular calculando los porcentajes de las células parentales y las de sus progenitores, que se definieron como el porcentaje de un determinado tipo de células dentro de la población de células de las que se aislaron (Tabla suplementaria 2, Anexos). Los protocolos de laboratorio para el aislamiento de células, los reactivos, la selección y el análisis por citometría de flujo se han descrito previamente en detalle (104). El número de acceso de los datos de citometría de flujo sin procesar y los archivos de datos analizados están disponibles a pedido de los autores (<http://hfgp.bbmri.nl>).

Además de los análisis celulares también se realizó un análisis proteómico en muestras de suero y plasma de la población del HFGP. Las proteínas circulantes se midieron utilizando el ensayo de extensión de proximidad (panel de inflamación Olink®, Olink, Suecia) que dio como resultado la medición de 103 biomarcadores diferentes (Tabla suplementaria 3, Anexos). Los niveles de proteínas se expresaron en escala \log_2 como valores de expresión de proteínas y se normalizaron utilizando muestras puente para corregir la variación entre lotes.

Para tener en cuenta las comparaciones múltiples en el estudio de autofagia, utilizamos un umbral de significación de $1,21 \times 10^{-4}$ y $1,37 \times 10^{-4}$ para el análisis proteómico y de recuento de células sanguíneas, respectivamente. Todos los análisis funcionales se realizaron utilizando el software R (<http://www.r-project.org>), utilizando

scripts personalizados en el lenguaje de programación R basados en funciones existentes. Los gráficos funcionales se mostraron utilizando el software Prism®.

4.6 Correlación entre los SNPs identificados y las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroideas

A continuación, investigamos la correlación de los SNPs de interés con los niveles de 7 hormonas esteroides plasmáticas (androstenediona, cortisol, 11-desoxicortisol, 17-hidroxiprogesterona, progesterona, testosterona y 25-hidroxivitamina D3) en 279 sujetos seleccionados del proyecto HFGP, quienes no recibían terapias de reemplazo hormonal ni utilizaban anticonceptivos orales. Las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroides se determinaron mediante espectrometría de masas en tándem con cromatografía, después de la precipitación de proteínas y extracción en fase sólida, siguiendo los protocolos previamente reportados.

Tras la transformación logarítmica de los datos, la correlación entre los niveles de hormonas esteroides y los SNPs identificados se evaluó mediante análisis de regresión lineal, ajustado por edad y sexo. El umbral de significación se estableció considerando el número de SNPs independientes analizados y el número de hormonas determinadas.

4.7 Análisis funcionales in silico

Finalmente, para evaluar el papel funcional de los SNPs seleccionados desde otra perspectiva, se llevaron a cabo análisis in silico con diversas herramientas:

- **Haploreg**

(<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) se utilizó para predecir el papel funcional de los SNPs seleccionados (Ward & Kellis, 2012). Además, se evaluó

si todos estos SNPs de autofagia podrían representar loci de expresión cuantitativa (eQTL) para diferentes tipos de células y tejidos, utilizando datos del portal GTEx disponibles públicamente (<https://gtexportal.org/home/>).

- **QTLbase** se utilizó para verificar todas las características de los QTL (<http://www.mulinlab.org/qtlbase>). QTLbase agrega datos de diversas fuentes, incluyendo TCGA, GTEx, Pancan-MNVQTLdb y DICE. Para completar estos análisis funcionales in silico, se desarrollaron meta-puntuaciones que integran diversas anotaciones o puntuaciones individuales en una única puntuación cuantitativa (Zheng et al., 2020). Esta puntuación combinada considera datos sobre conservación, frecuencia poblacional y el impacto en las propiedades fisicoquímicas de la proteína estudiada.

- **Regulome DB** (<https://regulomedb.org/>), y **FORGEdb** (<https://forge2.altiusinstitute.org/files/foragedb.html>) se utilizaron para proporcionar información adicional sobre el papel funcional de las variantes más prometedoras.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

En este estudio se incluyeron 276.608 individuos, 9.989 casos de ADP y 266.619 controles de las poblaciones PanScan I-III, 8.740 casos y 7.036 controles de la cohorte PanC4 y 1.249 casos y 259.583 controles del estudio FinnGen. Un total de 45.036 SNPs no mostraron desviación en el equilibrio de Hardy Weinberg por lo que fueron incluidos para el análisis de asociación. Tras realizar el test de Hardy Weinberg en el grupo control mediante un test chi-cuadrado, el metaanálisis de las estimaciones de asociación de estos SNP en las cohortes PanScan I-III+PanC4 y FinnGen mostró que 60 polimorfismos estaban asociados con el riesgo a desarrollar ADP ($p \leq 0,05$) en ambas cohortes.

Tras filtrar por valores de desequilibrio de ligamiento (LD) ($r^2 < 0,1$) y una frecuencia alélica menor (MAF) de 0,01, se obtuvieron 26 SNPs independientes asociados con el riesgo a desarrollar ADP. Entre ellos, se definieron 9 SNPs con un riesgo de ADP con nivel $p < 10^{-4}$ (Tabla 4).

Entre los SNPs identificados, el SNP *BID*_{rs9604789} presentaba una asociación significativa con el riesgo de ADP ($p < 1,72 \times 10^{-5}$) Tras el metaanálisis de las tres cohortes europeas, el SNP *BID*_{rs9604789} tiene un aumento del riesgo de padecer ADP en comparación con el alelo más frecuente (OR=1,31, $p = 9,67 \times 10^{-6}$) (Tabla 5). La asociación permaneció significativa tras la corrección de comparaciones múltiples de Bonferroni. Este hecho está sustentado en la literatura al estar comunicado que el SNP *BID*_{rs9604789} afecta al estado de la cromatina en numerosas estirpes celulares, especialmente en monocitos, células T reguladoras, células T helper, células T CD8+, células B, células NK y neutrófilos.

SNP	Gen	Chr	AI	MAF	PanScan+PanC4 (n=15.776)		FinnGen R10 (n=314.924)		Meta-análisis (n=330.700)*		
					OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	P _{int}
rs9604789	<i>BID</i>	22	A	0.017	1.33 (1.13-1.56)	4.76E-04	1.34 (1.07-1.68)	0.0107	1.33 (1.17-1.52)	1.52E-05	0.9375
rs11653998	<i>ERBB2</i>	17	C	0.335	1.09 (1.04-1.14)	7.34E-04	1.08 (0.98-1.18)	0.1196	1.09 (1.04-1.13)	2.02E-04	0.9283
rs11540923	<i>MAP1LC3B</i>	16	C	0.029	0.73 (0.62-0.86)	1.30E-04	0.52 (0.23-1.16)	0.1087	0.72 (0.61-0.84)	4.72E-05	0.4182
rs72552382	<i>MTOR</i>	1	C	0.015	1.52 (1.23-1.88)	1.33E-04	0.67 (0.22-2.09)	0.4911	1.48 (1.2-1.82)	2.89E-04	0.1659
rs75447274	<i>NBR1</i>	17	T	0.031	0.77 (0.67-0.90)	6.50E-04	0.91 (0.67-1.24)	0.5697	0.80 (0.70-0.91)	8.94E-04	0.3368
rs78344309	<i>PEX14</i>	1	T	0.070	0.81 (0.72-0.92)	9.99E-04	0.87 (0.69-1.10)	0.2530	0.83 (0.74-0.92)	5.67E-04	0.6135
rs1515496	<i>TP63</i>	3	G	0.389	0.88 (0.84-0.92)	3.50E-08	1.05 (0.94-1.17)	0.3907	0.89 (0.85-0.93)	6.27E-08	0.1725
rs35389543	<i>TP63</i>	3	C	0.099	1.17 (1.08-.26)	1.48E-04	1.15 (0.99-1.34)	0.0727	1.16 (1.08-1.25)	2.74E-05	0.8619
rs9882798	<i>TP63</i>	3	A	0.096	1.17 (1.08-1.26)	1.39E-04	1.05 (0.90-1.22)	0.5464	1.14 (1.06-1.22)	2.61E-04	0.2141

SNP: polimorfismo de nucleótido simple, Chr: número de cromosoma, AI: alelo asociado al efecto, MAF: frecuencia alelo menos frecuente.

Tabla 4 SNP asociados con la autofagia en las diferentes cohortes

					PanScan+PanC4 (n=15.776)	FinnGen (n=314.924)	PANDoRA (n=6.881)	Metaanálisis (n=337.581)					
SNP	Gen	Ch	EA	MAF	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P _{Meta}	P _{Het}
rs9604789	BID	22	A	0.02	1.33 (1.13-1.56)	4.70E-04	1.34 (1.07-1.68)	0.0107	1.19 (0.89-1.60)	0.251	1.31 (1.16-1.47)	9.674E-06	0.7868

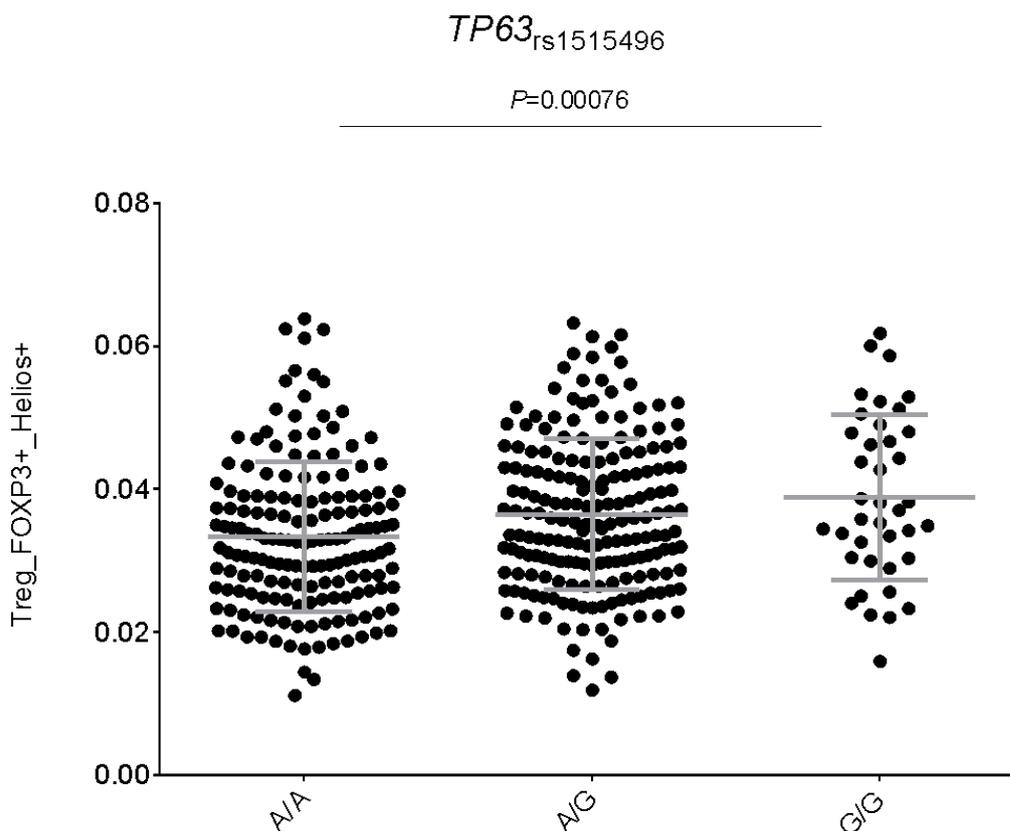
Tabla 5. Metaanálisis de la asociación entre el SNP del gen BID y el riesgo de ADP. EA: alelo de efecto

Este estudio también reveló otras asociaciones prometedoras para otros 8 SNPs en los genes *TP53*, *TP63*, *ERBB2*, *MAP1LC3B*, *PEX14* y *MTOR* con un riesgo de ADP con nivel $p < 10^{-4}$. En base a estos hallazgos, se replicaron y genotiparon estos SNPs en la cohorte PANDoRa.

Se identifican tres SNPs en el gen *TP63*, localizados en un locus ya conocido como marcador implicado en la susceptibilidad al ADP. Los resultados muestran que los portadores de *TP63*_{rs1515496G} y de *TP63*_{rs35389543C} presentaron un menor riesgo de desarrollar ADP (OR=0,89, $p=6.27 \times 10^{-8}$ and OR=1,16, $p=2,74 \times 10^{-5}$). La asociación permaneció significativa tras la corrección de comparaciones múltiples de Bonferroni ($p_{\text{Bonferroni}}=1,72 \times 10^{-5}$) para *TP63*_{rs1515496}, mientras que para *TP63*_{rs35389543} permaneció marginalmente positivo

Además de los estudios genéticos y dado que *TP63*_{rs1515496} es un biomarcador de riesgo de ADP conocido, evaluamos por primera vez el impacto sobre la respuesta inmunológica. Nuestros datos mostraron una correlación entre el alelo *TP63*_{rs1515496} con un aumento de las células T reguladoras FOXP3+Helios+ ($p=7,67 \times 10^{-4}$) (Figura 7) y de

las células T reguladoras CD45RA+ ($p=1,56 \times 10^{-3}$) (Figura 8) junto con un descenso de las células T reguladoras CD4+ ($p=7,86 \times 10^{-4}$) (Figura 9). Aunque los valores de p de estos datos funcionales no alcanzaban el valor de significación estadística tras la corrección de comparaciones múltiples de Bonferroni (establecida en $p=6,1 \times 10^{-5}$) estos resultados, unidos a los hallazgos genéticos sugieren un modesto, pero, aun así, efecto funcional de locus *TP63* en la modulación del riesgo de sufrir ADP ya que podría estar



regulando el número de las células T reguladoras.

Figura 7 Correlación en el *TP63*_{rs1515496} con las células T reguladoras FOXP3+/Helios+. Se aprecia un aumento en los portadores del alelo G/G

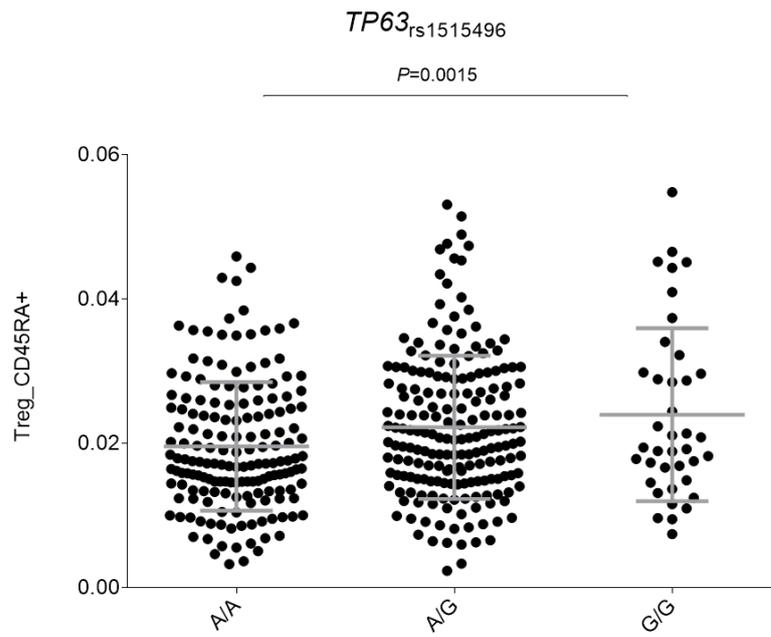


Figura 8. Correlación en el *TP63*_{rs1515496} con las células T reguladoras CD45RA+. Se aprecia un aumento en los portadores del alelo G/G

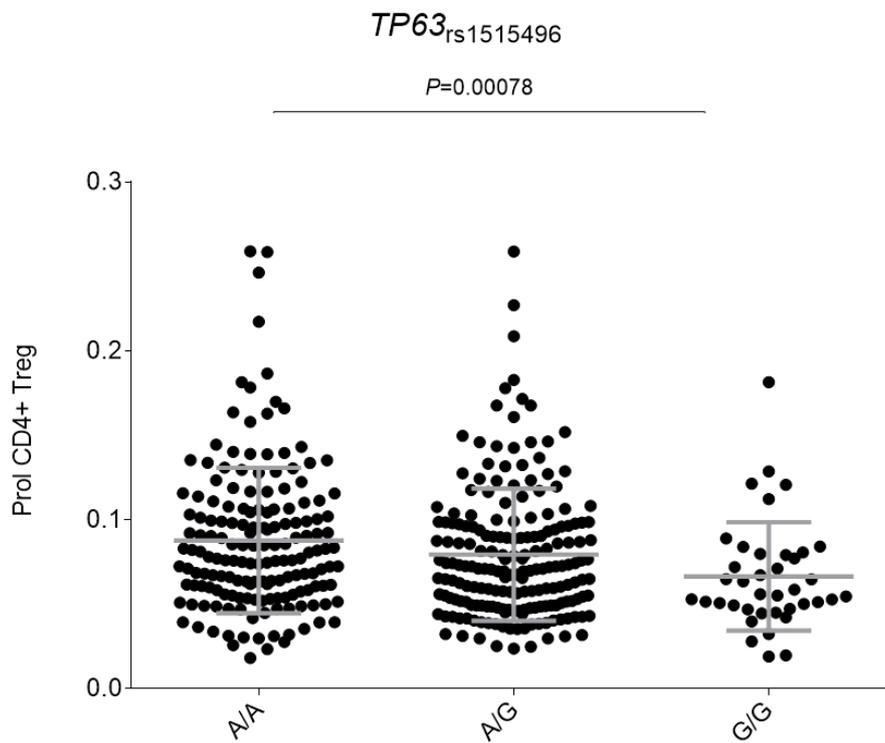


Figura 9. Correlación en el *TP63*_{rs1515496} con las células T reguladoras CD4+. Se aprecia una disminución en los portadores del alelo G/G

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El papel de la autofagia en la aparición, desarrollo, pronóstico y tratamiento del ADP es un campo prometedor de investigación. Esta tesis es el resultado de un trabajo exhaustivo de investigación de variantes relacionadas con la modulación del riesgo de ADP en 3 grandes cohortes independientes que incluyeron 13.215 casos de ADP y más de 270.000 controles sanos.

Uno de los principales puntos fuertes de este trabajo es la identificación por primera vez del SNP *BID*_{rs9604789} como asociado con un incremento del riesgo de ADP.

El gen *BID* (*BH3 Interacting Domain Death Agonist*) se localiza en el cromosoma 22 y es principalmente conocido por su papel proapoptótico dentro de la familia *Bcl2*. Juega un papel fundamental en la interrelación entre la apoptosis y la respuesta inmune innata del huésped. La proteína *BID* interacciona con *NOD1*, *NOD2* y proteínas del complejo *IKK* para promover la activación de NFκB y la inducción de la vía de señalización de la kinasa ERK. Esto conlleva la promoción de la supervivencia de los macrófagos de manera independiente a la inducción de la apoptosis mediada por *BID*(105).

Está publicado que en ratones doble knockout para *BID*, sus macrófagos presentan un marcado déficit en la producción de IL6 y de TNFα tras la estimulación por agonistas de *NOD2*, lo que sugiere que los disruptores de *BID* influyen en la modulación de la producción de citoquinas (106).

El SNP *BID*_{rs9604789} se ha asociado con alteraciones del estado de la cromatina y la modulación de histonas en múltiples células inmunitarias. Además, se ha

asociado con la alteración de los puntos de unión de múltiples factores de transcripción como *NFκB*, *POL2*, *TAF1*, *TCF12*, *EGR1*, *GABP*, *TBP*, *POL24H8* and *PAX5N19*, cuyo papel en la regulación de procesos inmunes está claramente establecido(105). Aun así, en este trabajo no ha sido posible establecer el papel inmunológico de *BID*_{rs9604789}, ya que no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con la producción de citoquinas en ensayos *in vitro*, ni en el número de poblaciones celulares derivadas de sangre periférica, ni en los niveles séricos de mediadores de la inflamación o de hormonas esteroideas.

Considerando estos resultados, lo más plausible es que el SNP *BID*_{rs9604789} modifique el riesgo de padecer ADP mediante la modulación de la muerte celular mediada por la autofagia y/o la apoptosis (Figura 9). Se ha publicado que *BID* juega un papel crucial en la vía de las caspasas. Cuando las células reciben señales proapoptóticas, a través de receptores como Fas, la caspasa 8 se activa y escinde la proteína BID, generando una forma truncada denominada tBID. Esta forma trasloca a las mitocondrias donde interactúa con proteínas proapoptóticas como BAX y BAK, promoviendo la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y la liberación del citocromo c. Esto provoca la activación en el citoplasma de la caspasa 9 y subsecuentemente de caspasas ejecutoras como la caspasa 3, lo que resulta en la amplificación de la señal apoptótica. Adicionalmente, la caspasa 3 también es capaz de escindir la proteína BID por lo que se genera un bucle de retroalimentación que potencia la señal apoptótica (107,108).

En esta línea de pensamiento, se ha publicado que las mutaciones en *BID* que afectan a la fosforilación de la proteína regulan la producción de IL6 de manera diferente tras la estimulación de los macrófagos con muramil-dipeptido, un agonista de *NOD2*. Por todo lo recogido, es plausible sugerir que el SNP *BID*_{rs9604789} podría desregular la

respuesta inmune innata dependiente de *BID*, así como la supervivencia de los macrófagos, influyendo al final en el desarrollo tumoral (105).

A nivel somático, la ganancia en el número de copias, así como la sobreexpresión, es un evento frecuente en muestras tumorales, especialmente en el ADP, estando presentes hasta en el 6% de los casos (109).

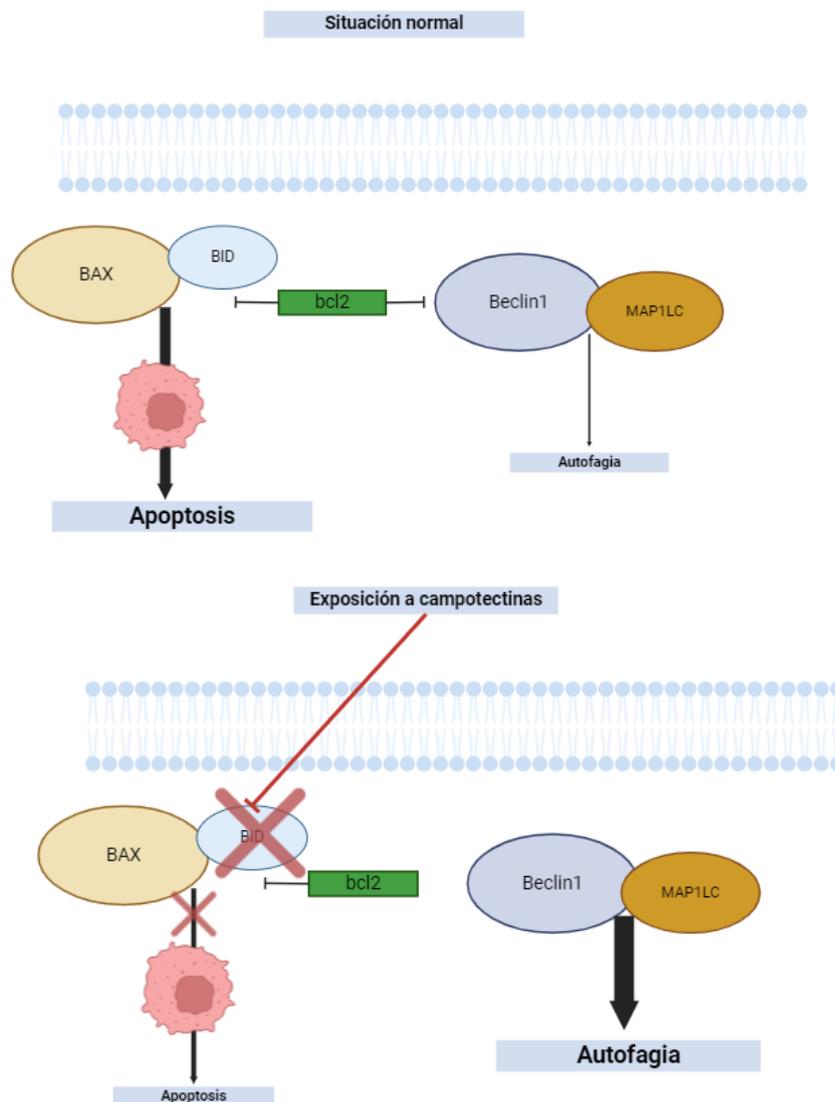


Figura 10. *BID* como punto de inflexión del cambio entre la señal apoptótica y de la autofagia. El bloqueo de *BID* permite a Beclin1 liberarse de la inhibición de *bcl2* e iniciar el proceso de la autofagia. Adaptado de Lamparska-Przybysz M. Generado con Biorender

Además de la identificación del SNP *BID*_{rs9604789}, los resultados de nuestro metaanálisis en tres poblaciones europeas han validado los datos de estudios previos que mostraron que determinados SNPs (así como los SNPs con desequilibrio de ligamiento) en *TP63* están asociados con el riesgo de ADP.

El mayor efecto se ha observado para el SNP *TP63*_{rs1515496}, que mantiene la significación estadística tras la corrección de comparaciones múltiples de Bonferroni y se mantiene por debajo del corte clásico para la significación estadística en un GWAS ($p=5.0 \times 10^{-8}$). Aunque el riesgo con el cáncer de páncreas está claramente establecido, su papel biológico no está claramente dilucidado (100).

Este trabajo ha demostrado que los donantes sanos del SNP *TP63*_{rs1515496} tienen un aumento de las cifras de células T reguladoras FOXP3+ Helios+ y de las células T reguladoras CD45RA+ además de un descenso de células T reguladoras CD4+ que tienen un papel importante en la actividad supresora de tumores.

Además, es importante tener en cuenta que *TP63* está frecuentemente sobreexpresado en muestras tumorales de ADP y cuya expresión se correlaciona con una mayor agresividad de la enfermedad (110).

Por otra parte, es razonable sugerir que el SNP *TP63*_{rs1515496} (o los polimorfismos en desequilibrio de ligamiento) podría influir en la función proteica al alterar el proceso de splicing, lo que daría lugar a diferentes isoformas de la proteína. A este respecto, se ha publicado que las isoformas TAp63 se asocian con muerte celular y secuestro del ciclo celular con función supresora tumoral, mientras que la isoforma Δ Np63, la más común en líneas celulares de ADP, tiene un papel opuesto, favoreciendo el crecimiento y la invasión tumoral (111).

Finalmente, hay que destacar que nuestro estudio identificó otros loci en *MAP1LC3B*, *ERBB2*, *MTOR*, *PEX14* y *NRB1*. A pesar de no alcanzar el umbral de significación estadística tras el test de comparaciones múltiples y, por lo tanto, no haber sido seleccionados para su replicación en la cohorte PANDoRA, consideramos que son marcadores potencialmente interesantes que merecen un análisis más profundo en estudios futuros. En particular, se ha informado que los genes *MAP1LC3B* y *ERBB2*, cuyos SNPs mostraron una asociación con el riesgo de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) cercana al umbral de significación de Bonferroni, podrían desempeñar un papel en la supervivencia de las células tumorales y en la resistencia a los tratamientos. La respuesta a proteínas mal plegadas protege a las células tumorales humanas durante la hipoxia, mediante la regulación de *MAP1LC3B*, un gen involucrado en la expansión del fagóforo y la formación de autofagosomas (112) Además, se ha vinculado la expresión de la proteína MAP1LC3B en CAF, con una menor supervivencia en pacientes con PDAC, lo que sugiere su papel en la resistencia inmune adaptativa de las células tumorales (113).

De manera similar, es conocido en la literatura el papel de *ERBB2* con la predisposición y el pronóstico de los pacientes con ADP. Este gen está frecuentemente amplificado en pacientes con ADP, y su efecto oncogénico no solo se debe a la amplificación del gen, sino también a su sobreexpresión. Una alta proporción de tumores muestran sobreexpresión de *ERBB2*, lo que sugiere su participación no solo en el inicio de la enfermedad, sino también en su progresión y en la supervivencia de los pacientes (114). No obstante, se requieren más estudios para delinear con precisión el papel de *MAP1LC3B* y *ERBB2* en la patogénesis del ADP, ya que algunos estudios previos han indicado que estos genes podrían no influir en la progresión de la enfermedad (114).

Entre las fortalezas de este proyecto, destaca el estudio pormenorizado de los SNPs relacionados con la autofagia y la inclusión de tres grandes cohortes europeas que incluyen un total de 276.608 participantes. Además, se ha realizado el análisis funcional de los SNP en la modulación de la respuesta inmune innata, las poblaciones celulares derivadas de progenitores hematopoyéticos, los metabolitos séricos y plasmáticos y los niveles de hormonas esteroideas en un gran estudio de portadores sanos del proyecto HFGP. El volumen de datos proporcionado por el HFGP es una ventaja fundamental porque permite realizar análisis robustos al incluir una gran cantidad de sujetos. Ofrece información detallada sobre la variabilidad genética y su relación con diversas respuestas biológicas, lo que aumenta la capacidad de detectar asociaciones importantes entre variantes genéticas y funciones fisiológicas. Este extenso conjunto de datos permite no solo examinar el impacto de SNPs individuales, sino también explorar interacciones más complejas entre múltiples variantes genéticas y diferentes procesos biológicos, como la autofagia.

La multicentricidad del proyecto supone limitaciones inevitables derivadas de la imposibilidad para la recogida uniforme de la información citogenética que hubiera permitido realizar un análisis estratificado. No obstante, los análisis de asociación estratificados por la presencia de alteraciones citogenéticas específicas podrían haber carecido de potencia suficiente para detectar asociaciones modestas. Otra limitación inherente al diseño del proyecto es que se ha realizado en poblaciones de ascendencia europea, lo que limita la validez externa y la extrapolación de los resultados a otros grupos étnicos.

El análisis en un rango 5 kb aguas arriba y 3 kb aguas debajo de los SNPs seleccionados suele ser suficiente para localizar las variantes más relevantes, incluyendo

aquellas situadas en promotores y regiones no traducidas que podrían tener impacto en la función génica. Sin embargo, elementos reguladores, como potenciadores y represores pueden existir fuera de estas regiones. (115)

Por último, la falta de variables ambientales no permitió la realización de análisis de interacción entre ambiente y genes por lo que no se pudo explorar en este estudio la influencia de factores ambientales en el desarrollo de ADP.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

El CP es una enfermedad habitualmente letal para la que no existen medidas efectivas de diagnóstico precoz y que suele diagnosticarse en estadios avanzados. El establecimiento de consorcios internacionales permite el desarrollo de proyectos de investigación para la identificación de factores genéticos de susceptibilidad al cáncer que permitan establecer medidas personalizadas en aquellos individuos portadores de condiciones de predisposición al cáncer.

En este trabajo se ha descrito por primera vez la relación entre el gen *BID* y la modulación del riesgo de ADP, mediante la identificación del SNP *BID*_{rs9604789}. Dilucidar las consecuencias genéticas subyacentes a este hallazgo, será el objetivo de futuros proyectos de investigación.

El SNP *TP63*_{rs1515496} ha mostrado una asociación robusta con el riesgo de padecer ADP, sumándose a otros SNP de este gen ya identificados en otros trabajos.

El gen *TP63* es capaz de modular el riesgo de ADP a través de la regulación de diferentes poblaciones de células T, tanto a nivel cuantitativo como a nivel funcional.

Además, se han identificado SNPs prometedores en genes poco explorados en ADP como *MAP1LC3B*, *ERBB2*, *MTOR*, *PEX14* y *NRB1*, lo que garantiza su investigación en otros proyectos.

8. ARTÍCULO

Polymorphisms within autophagy-related genes as susceptibility biomarkers for pancreatic cancer: A meta-analysis of three large European cohorts and functional characterization

Fernando Gálvez-Montosa¹ | Giulia Peduzzi² | José Manuel Sanchez-Maldonado^{3,4,5,6} | Rob ter Horst^{7,8} | Antonio J. Cabrera-Serrano^{4,5} | Manuel Gentiluomo² | Angelica Macaudo⁶ | Natalia Luque¹ | Pelin Ünal⁶ | Francisco José García-Verdejo¹ | Yang Li^{7,8} | José Antonio López López¹ | Angelika Stein⁶ | H. Bas Bueno-de-Mesquita^{9†} | Paolo Giorgio Arcidiacono¹⁰ | Dalila Luciola Zanette¹¹ | Christoph Kahlert¹² | Francesco Perri¹³ | Pavel Soucek¹⁴ | Renata Talar-Wojnarowska¹⁵ | George E. Theodoropoulos¹⁶ | Jakob R. Izbicki¹⁷ | Hussein Tamás^{18,19} | Hanneke Van Laarhoven^{20,21} | Gennaro Nappo^{22,23} | Maria Chiara Petrone¹⁰ | Martin Lovecek²⁴ | Roel C. H. Vermeulen²⁵ | Kestutis Adamonis²⁶ | Fernando Jesus Reyes-Zurita³ | Bernd Hollecsek^{27,28} | Jolanta Sumskiene²⁶ | Beatrice Mohelníková-Duchoňová²⁹ | Rita T. Lawlor^{30,31} | Raffaele Pezzilli³² | Mateus Nobrega Aoki¹¹ | Claudio Pasquali³³ | Vitalija Petrenkiene²⁶ | Daniela Basso³⁴ | Stefania Bunduc^{18,19,35,36} | Annalisa Comandatore³⁷ | Hermann Brenner^{28,38} | Stefano Ermini² | Giuseppe Vanella^{39,40} | Mara R. Goetz¹⁷ | Livia Archibugi^{39,40} | Maurizio Lucchesi⁴¹ | Faik Guntac Uzunoglu¹⁷ | Olivier Busch^{21,42} | Anna Caterina Milanetto³³ | Marta Puzzono⁴³ | Juozas Kupcinskas²⁶ | Luca Morelli³⁷ | Cosimo Sperti³³ | Silvia Carrara⁴⁴ | Gabriele Capurso^{39,40} | Casper H. J. van Eijck⁴⁵ | Martin Oliverius⁴⁶ | Susanne Roth¹² | Francesca Tavano¹³ | Rudolf Kaaks⁴⁷ | Andrea Szentesi⁴⁸ | Ludmila Vodickova^{49,50,51} | Claudio Luchini^{30,52} | Ben Schöttker²⁸ | Stefano Landi² | Orsolya Dohan¹⁹ | Matteo Tacelli¹⁰ |

Fernando Gálvez-Montosa, Giulia Peduzzi, and José Manuel Sanchez-Maldonado share first authorship.

Daniele Campa and Juan Sainz share last authorship.

† Deceased researcher.

For affiliations refer to page 348

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Author(s). *International Journal of Cancer* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of UICC.

William Greenhalf⁵³ | Maria Gazouli⁵⁴  | John P. Neoptolemos¹² |
 Giulia Martina Cavestro⁴³ | Ugo Boggi⁵⁵ | Anna Latiano¹³ |
 Péter Hegyi^{18,19,48,56} | Laura Ginocchi⁴¹ | Mihai G. Netea^{57,58} |
 Pedro Sánchez-Rovira¹ | Federico Canzian⁶  | Daniele Campa²  |
 Juan Sainz^{3,4,5,59}  

Correspondence

Juan Sainz, Department of Biochemistry and Molecular Biology I, University of Granada, Avenida Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain.

Email: jsainz@ugr.es

Funding information

Czech Republic Ministry of Health
 Grant/Award Number: GACR21-27902 and AZVNU21-03-00145; "Casa Sollievo della Sofferenza" Hospital, San Giovanni Rotondo; Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades and FEDER, Grant/Award Number: PY20/01282; Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Numbers: PI17/02256, PI20/01845; Associazione Italiana Ricerca Cancro, Grant/Award Number: 26343; National Institute for Cancer Research (Programme EXCELES), Grant/Award Number: LX22NPO5102; Charles University, Project GA UK No. 120, Grant/Award Number: UNCE/MED/006

[Correction added on 07 November 2024, after first online publication: The name of the author "Francisco José García-Verdejo" has been corrected.]

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal cancers with patients having unresectable or metastatic disease at diagnosis, with poor prognosis and very short survival. Given that genetic variation within autophagy-related genes influences autophagic flux and susceptibility to solid cancers, we decided to investigate whether 55,583 single nucleotide polymorphisms (SNPs) within 234 autophagy-related genes could influence the risk of developing PDAC in three large independent cohorts of European ancestry including 12,754 PDAC cases and 324,926 controls. The meta-analysis of these populations identified, for the first time, the association of the *BID*_{rs9604789} variant with an increased risk of developing the disease ($OR_{Meta} = 1.31$, $p = 9.67 \times 10^{-6}$). We also confirmed the association of *TP63*_{rs1515496} and *TP63*_{rs35389543} variants with PDAC risk ($OR = 0.89$, $p = 6.27 \times 10^{-8}$ and $OR = 1.16$, $p = 2.74 \times 10^{-5}$). Although it is known that *BID* induces autophagy and *TP63* promotes cell growth, cell motility and invasion, we also found that carriers of the *TP63*_{rs1515496G} allele had increased numbers of FOXP3+ Helios+ T regulatory cells and CD45RA+ T regulatory cells ($p = 7.67 \times 10^{-4}$ and $p = 1.56 \times 10^{-3}$), but also decreased levels of CD4+ T regulatory cells ($p = 7.86 \times 10^{-4}$). These results were in agreement with research suggesting that the *TP63*_{rs1515496} variant alters binding sites for FOXA1 and CTCF, which are transcription factors involved in modulating specific subsets of regulatory T cells. In conclusion, this study identifies *BID* as new susceptibility locus for PDAC and confirms previous studies suggesting that the *TP63* gene is involved in the development of PDAC. This study also suggests new pathogenic mechanisms of the *TP63* locus in PDAC.

KEYWORDS

autophagy, functional characterization, genetic variants, pancreatic cancer, polymorphisms, susceptibility

What's new?

The etiology of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), among the most aggressive and deadliest cancers worldwide, remains largely unknown. Here, using data from cohorts of European ancestry, the authors investigated the influence on PDAC risk of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes associated with autophagy. Analyses identified multiple SNPs associated with PDAC risk, including variants within *BID* and *TP63*. Variants in *BID* potentially dysregulate *BID*-dependent autophagy, while those in *TP63* may influence PDAC risk by modulating levels of T regulatory cells involved in host immune responses against tumor cells. The variants warrant further study to better elucidate their involvement in PDAC.

1 | INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common form of pancreatic cancer¹⁻³ with a worldwide incidence that has been increasing over decades and it is somewhat higher in males than females (6.7 vs. 6.0 cases per 100,000 people per year, respectively; <https://gco.iarc.fr/today/home>). Early diagnosis of PDAC is hampered by the lack of specific screening tests and by the fact that most of the patients do not have symptoms or if they do, they are very unspecific.^{3,4} Consequently, PDAC is frequently diagnosed at late stages leading to an extremely poor prognosis and a 5-year survival rate that ranges from 2% to 10%.⁵ Several environmental factors (including exposure to pesticides, asbestos, benzene, and chlorinated hydrocarbons) and lifestyle risk factors (cigarette smoking, obesity, family history of cancer, pancreatitis, type 2 diabetes, heavy alcohol consumption, low physical activity, stress, mobile phone use, allergies, and poor oral health) have been identified for PDAC.^{2,6-8} Furthermore, around 30 genetic susceptibility loci have been identified through genome wide association studies (GWAS) and large candidate gene or candidate region studies.⁹⁻¹⁶ However, PDAC continues to be one of the most aggressive and lethal diseases with still a relatively unknown etiology.^{17,18}

Recent evidence suggests that autophagy, a lysosome-dependent catabolic degradation process involved in removing toxic air pollutants, particulate particles and heavy metals, but also toxic aggregated cytosolic proteins and malfunctioning organelles from normal cells, might influence the onset of solid tumors and blood malignancies.¹⁹⁻²¹ In PDAC, several studies have demonstrated that pancreatic tumoral tissues have an increased autophagy flux and a greater number of autophagosomes²² in comparison to normal pancreatic cells.^{23,24} Furthermore, it has been shown that autophagy participates in controlling multiple processes including tumor cell growth, metabolism, MHC-I and MHC-II presentation,^{25,26} cell migration and metastasis.²⁷ These findings, along with the fact that treatment with chloroquine (an autophagy inhibitor) or the genetic ablation of autophagy initiation genes (ATG5 or ATG7) reduced the growth of human PDAC cell lines,²³ suggest that autophagy might represent a potential target for PDAC treatment. In support of this hypothesis, studies using xenografts or animal models have shown the benefit of inhibiting autophagy to induce tumor regression and prolong survival.²⁸⁻³⁰ In addition, autophagy is implicated in controlling the resistance to apoptosis³¹ and, therefore, it might represent a poor prognostic factor for PDAC.³² Nonetheless, several studies have also suggested an anti-tumorigenic effect of autophagy in PDAC^{33,34} and some clinical trials using autophagy inhibitors have shown limited success.^{35,36}

Considering the above-reported results, but also previous findings suggesting that genetic variation within autophagy-related genes influences autophagic flux and the susceptibility to solid and hematological cancers,^{37,38} we decided to comprehensively evaluate the impact of 55,583 common genetic variants within 234 autophagy-related genes in determining the risk of developing PDAC. Understanding the impacts of environmental exposure through autophagy and how this catabolic process is genetically regulated might offer

new approaches for risk assessment, protection and preventive actions against cancer. Given the known role of autophagy in shaping immune responses, inflammation and immune tolerance³⁹ and its potential role in regulating immunotherapy efficacy,⁴⁰ we also assessed the correlation of the most promising autophagy variants with cytokine production after *in vitro* stimulation of whole blood (WB), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), or monocyte-derived macrophages (MDM) with lipopolysaccharide (LPS), phytohemagglutinin (PHA), Pam3Cys or CpG. Additionally, we assessed the impact of genetic variants in autophagy genes on the absolute numbers of 91 blood-derived cell populations, 103 serum immunological proteins, and 7 steroid hormones in a large cohort of 408 healthy donors (500FG) from the Human Functional Genomic Project (HFGP).⁴¹

2 | MATERIALS AND METHODS

A workflow diagram of the study is included as Figure 1.

2.1 | Study populations

The discovery population consisted of 15,776 subjects from previous GWAS on PDAC conducted by the Pancreatic Cancer Cohort (PanScan I-III),⁴²⁻⁴⁴ and the Pancreatic Cancer Case-Control (PanC4) consortia⁴⁵ (Figure 1). In these studies, the PDAC cases presented an established diagnosis and controls were blood donors or healthy subjects randomly selected from the general population and with no history of previous cancers. As part of the discovery cohorts, we also included the FinnGen research genomic project, which arose from Finnish biobanks and digital health record data from Finnish health registries (<https://www.finnngen.fi/en>). At the time this study was conducted, FinnGen (Data Freeze 10 or Ristey10) included genetic data of 314,924 individuals (731 PDAC cases and 314,193 controls).

2.2 | SNP selection and meta-analysis of discovery cohorts

A total of 234 autophagy-related genes were selected based on their presence in the autophagy database (<http://autophagy.lu/clustering/index.html>; Table S1) and association of 55,583 genotyped or imputed SNPs within or near these genes (5 kb upstream and 3 kb downstream)⁴⁶⁻⁴⁸ with PDAC risk was computed from a GWAS conducted in the PanScan I-III and the PanC4 population. GWAS datasets were downloaded from the NCBI database of genotypes and phenotypes (dbGaP; study accession numbers phs000206.v5.p3 and phs000648.v1.p1; project reference no. 12644), namely PanScan I, PanScan II and PanC4. These PanScan I-III + PanC4 GWAS were subjected to rigorous standard quality control protocols before imputation using the Michigan imputation server (based on the Haplotype Reference Consortium).⁴⁹ After imputation, GWAS data were filtered to include only

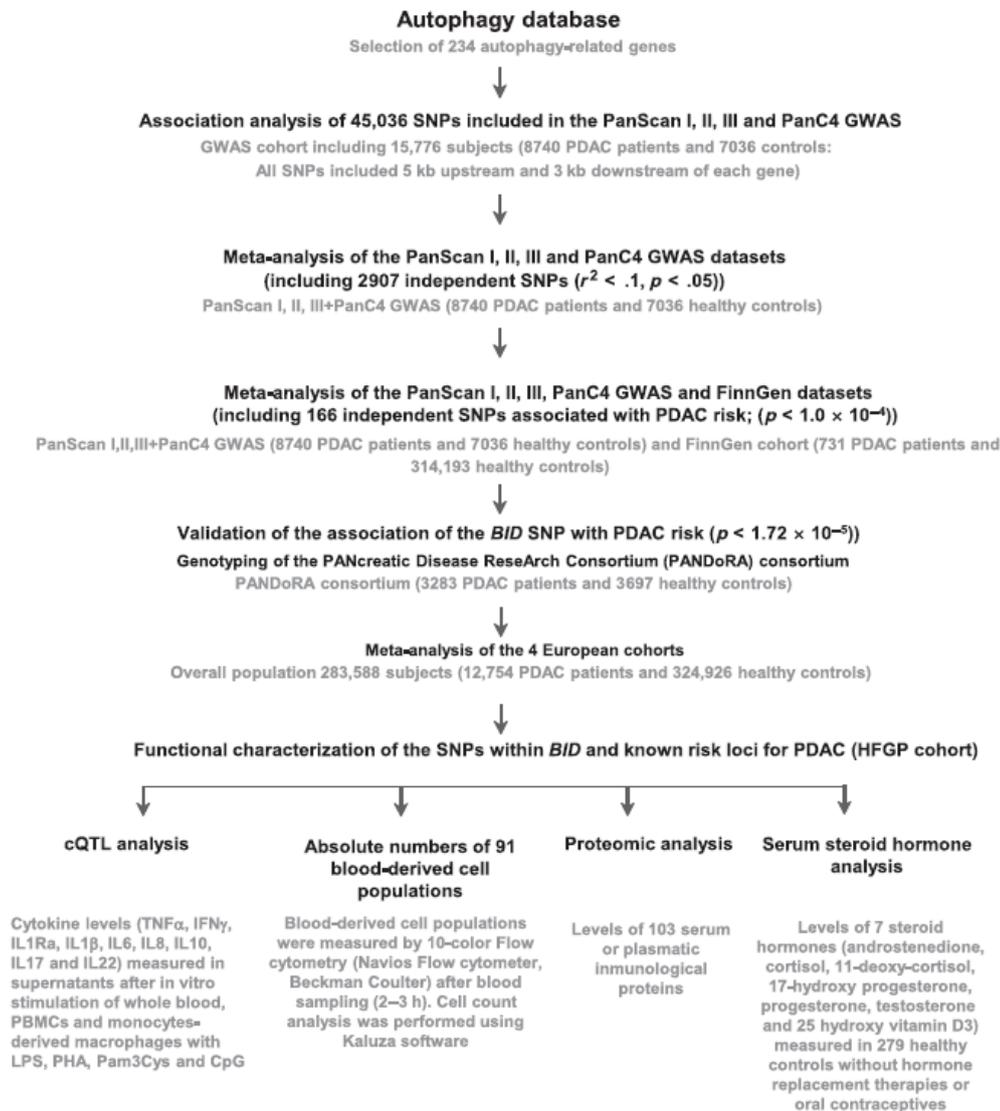


FIGURE 1 Flow diagram of the study.

high-quality imputed variants (info score >0.8). Further quality-control checks were implemented including checks for missingness, duplicates, abnormal heterozygosity, cryptic relatedness, population outliers (evaluated by principal components analyses using Eigenstrat software), and genomic inflation ($\lambda = 1.00$).⁵⁰ Detailed information about the genotyping technologies used, quality control, imputation, and ethnic composition of the discovery cohorts is provided as Data S1. A fixed-effect meta-analysis of the PanScan I–III + PanC4 and publicly available FinnGen GWAS data was conducted using METAL.⁵¹ The I^2 statistic was used to assess statistical heterogeneity between the study cohorts and pooled odds ratios (ORs) were computed using the fixed-effect model. Among the 55,583 selected variants, a total of 45,036 SNPs were shared by the GWAS

platforms and were, therefore, available for association analysis. Of those 45,036 variants, a total of 2907 SNPs were considered independent ($r^2 < .1$) according to LDLink data for European cohorts (<https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=snpclip>), and therefore, the multiple testing significance threshold for the study was set to $p = 1.72 \times 10^{-5}$ ($0.05/2907$ SNPs; Table S2). To select the most interesting markers for further validation, we excluded those SNPs that were previously reported as susceptibility markers for PDAC and we advanced for replication in the PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium only those markers that showed a significant association with PDAC risk after multiple testing correction ($p < 1.72 \times 10^{-5}$). Genotyping of the genetic markers included 3283 PDAC cases and 3697 controls.

2.3 | Genotyping and meta-analysis

Genotyping of genetic variants advanced for replication in PANDoRA was carried out at University of Pisa (Department of Biology, University of Pisa, Pisa, Italy) using KASPar (LGC Genomics, Hoddesdon, UK) according to previously reported protocols.^{52,53} For internal quality control, ~5% of samples were randomly selected and included as duplicates. Concordance between the original and the duplicate samples for the SNPs tested was ≥99.0%. Selected SNPs showed genotype frequencies in the control population similar to those found in the 1000 Genomes database (data not shown) and were in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). After the genotyping of selected markers in PANDoRA, an overall meta-analysis of the association estimates of PANDoRA with those from the PanScan I-III, PANC4, and FinnGen studies was conducted in R using the Meta package.⁵⁴

2.4 | Functional effect of the autophagy-related variants

To provide insight into the functional role of those SNPs that remained statistically significant after multiple correction ($p = 1.72 \times 10^{-5}$), but also those SNPs that are well-established susceptibility markers for PDAC, we tested if any of them were associated with cytokine expression quantitative trait loci (cQTL) data from in vitro stimulation experiments. We also tested the association with the absolute numbers of 91 blood-derived cell populations, 103 serum or plasmatic inflammatory proteins and 7 steroid hormones quantified in 408 volunteers from the 500 Functional Genomics (500FG) cohort from the HFGP.

2.4.1 | Correlation of autophagy-related SNPs with cQTL data

The cQTL data included cytokine levels (IFN γ , IL1 β , IL6, TNF α , IL17 and IL22) measured when peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), monocyte-derived macrophages (MDM), or whole blood from 408 healthy subjects were left untreated or stimulated for 24 h with LPS (1 or 100 ng/mL; Sigma Aldrich, St. Louis, MO), PHA (10 μ g/mL, Sigma, St. Louis, MO), Pam3Cys (10 μ g/mL, EMC microcollections, Tübingen, Germany) or CpG (100 ng/mL, InvivoGen, San Diego, CA). Detailed protocols for PBMCs isolation, macrophage differentiation and stimulation assays have been reported elsewhere.^{38,55} Briefly, PBMCs were washed twice in saline and suspended in medium (RPMI 1640) supplemented with gentamicin (10 mg/mL), L-glutamine (10 mM) and pyruvate (10 mM). PBMC stimulations were performed with 5×10^5 cells/well in round-bottom 96-well plates (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) for 24 h in the presence of 10% human pool serum at 37°C and 5% CO $_2$. Supernatants were collected and stored at -20°C until used for ELISA. Concentrations of human IFN γ , IL1 β , IL6, TNF α , IL17 and IL22 were determined using specific commercial ELISA kits (PeliKine Compact, Amsterdam or R&D

Systems), in accordance with the manufacturers' instructions. When values were below or above the detection limit of the ELISA, the corresponding limit was used. After log transformation, linear regression analyses adjusted for age and sex were used to determine the correlation of the selected SNPs with cQTL data.

2.4.2 | Correlation of autophagy SNPs and blood cell counts and serum/plasmatic proteomic profile

Next, we evaluated the impact of selected SNPs on cell-level variation. A total of 91 blood-derived cell populations were measured by 10-color flow cytometry (Navios flow cytometer, Beckman Coulter, Miami, FL) after blood sampling (2-3 h), and cell count analysis was performed using Kaluza software (Beckman Coulter, v.1.3). To reduce inter-experimental noise and increase statistical power, cell count analysis was performed by calculating parental and grandparental percentages, which were defined as the percentage of a certain cell type within the subpopulation of the cells from which it was isolated (Table S3).⁵⁵ Detailed laboratory protocols for cell isolation, reagents, gating, and flow cytometry analysis have been reported elsewhere⁵⁶ and raw flow cytometry data and analyzed data files are available upon reasonable request to the authors (<http://hfgp.bbmr.nl>, accessed on 13 February 2024). A proteomic analysis was also performed in serum and plasma samples from the HFGP study. Circulating proteins were measured using the proximity extension assay (Olink Inflammation panel, Olink, Sweden) that resulted in the measurement of 103 different biomarkers (Table S4). Protein levels were expressed on a log $_2$ -scale as normalized protein expression values and normalized using bridging samples to correct for batch variation. Considering the number of proteins ($n = 103$), blood-derived cell populations ($n = 91$), and SNPs ($n = 4$) tested, significance p -values were set to be 1.21×10^{-4} and 1.37×10^{-4} for the proteomic and blood cell count analyses, respectively.

2.4.3 | Correlation between autophagy-related SNPs and serum steroid hormone levels

Besides the immunological experiments, we also evaluated the correlation of autophagy SNPs with serum steroid hormone levels (androstenedione, cortisol, 11-deoxy-cortisol, 17-hydroxyprogesterone, progesterone, testosterone and 25 hydroxy vitamin D3) from 279 healthy controls of the 500FG cohort without hormone replacement or oral contraceptive therapies. Serum steroid hormone levels were determined by ELISA following the manufacturer's instructions. Correlation between levels of 7 serum steroid hormones and autophagy-related SNPs was evaluated by linear regression analysis adjusted for age and sex. The significance threshold was set to $p = .00178$ considering the number of independent SNPs tested ($n = 4$) and the number of hormones determined ($n = 7$).

All analyses of functional data were performed using R software (<http://www.r-project.org>), using custom scripts in the R programming

language based on existing functions such as *lm* (stats). Functional plots were displayed using the Prism software.

2.5 | In silico functional analysis

Haploreg (<http://www.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>)⁵⁷ was also used to predict the functional role of the autophagy SNPs. We also tested whether all these autophagy SNPs could represent expression quantitative trait loci (eQTL) for different cell types and tissues using publicly available GTex portal data (<https://gtexportal.org/home/>) and information available at the Blood eQTL browser (<https://genenetwork.nl/bloodeqtlbrowser/>).

3 | RESULTS

This study included 337,680 individuals consisting of 12,754 cases of PDAC and 324,926 controls, 8740 cases and 7036 controls from the PanScan I-III and PanC4 cohort, 731 cases and 314,193 controls from the FinnGen study and 3283 patients and 3697 healthy controls from the PANDORA cohort. A total of 45,036 SNPs showing no deviation from HWE ($p < .001$) neither in the PanScan I-III + PanC4 and FinnGen cohorts were selected for association analysis. After testing HWE in the control group by a standard observed-expected chi-square (χ^2) test ($p < 10^{-5}$) and filtering by linkage disequilibrium (LD) values ($r^2 < .1$) and a minor allele frequency (MAF) of 0.01, the meta-analysis of the association estimates for these SNPs in the PanScan I-III + PanC4 and FinnGen cohorts showed that nine polymorphisms were associated with the risk of developing PDAC at $p \leq 10^{-4}$ level (Table 1).

Importantly, among these 9 SNPs, we found a statistically significant association for a SNP within the *BID* locus with PDAC risk ($p < 1.72 \times 10^{-5}$). Therefore, it was advanced for replication and genotyped in PANDORA. Association results for this SNP are reported in Table 2. After the meta-analysis of the three European cohorts, we found that carriers of the *BID*_{rs9604789G} allele had an increased risk of developing PDAC when compared with those carrying the most frequent allele (OR = 1.31, $p = 9.67 \times 10^{-6}$; Table 2). The association of the *BID*_{rs9604789} SNP with PDAC risk remained significant after correction for multiple testing, which suggested that this variant might have a functional role in modulating PDAC risk. In support of this hypothesis, it has been reported that the *BID*_{rs9604789} SNP affects chromatin states in multiple primary cell types including primary monocytes from peripheral blood, T regulatory cells, T helper cells, CD8+ T cells, B cells, NK cells, and neutrophils.

Besides these results, we found three autophagy-related SNPs within the *TP63* locus that have been previously identified as susceptibility markers for PDAC. Our results confirmed that carriers of the *TP63*_{rs1515496G} *TP63*_{rs35389543C} alleles had decreased risk of developing PDAC (OR = 0.89, $p = 6.27 \times 10^{-8}$ and OR = 1.16, $p = 2.74 \times 10^{-5}$; Table 1). As expected, the association of the *TP63*_{rs1515496} SNP remained significant after correction for multiple

TABLE 1 Association analysis of autophagy-related SNPs in the discovery cohorts.

SNP	Gene	Chr	A1	MAF	PanScan + PanC4 (n = 15,776)		FinnGen R10 (n = 314,924)		Meta-analysis (n = 330,700) ^a		Direction	P _{Het}
					OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p		
rs9604789	BID	22	A	0.017	1.33 (1.13–1.56)	4.76E-04	1.34 (1.07–1.68)	.0107	1.33 (1.17–1.52)	1.52E-05	++	.9375
rs11653998	ERBB2	17	C	0.335	1.09 (1.04–1.14)	7.34E-04	1.08 (0.98–1.18)	.1196	1.09 (1.04–1.13)	2.02E-04	++	.9283
rs11540923	MAP1LC3B	16	C	0.029	0.73 (0.62–0.86)	1.30E-04	0.52 (0.23–1.16)	.1087	0.72 (0.61–0.84)	4.72E-05	–	.4182
rs72552382	MTOR	1	C	0.015	1.52 (1.23–1.88)	1.33E-04	0.67 (0.22–2.09)	.4911	1.48 (1.2–1.82)	2.89E-04	+-	.1659
rs75447274	NBR1	17	T	0.031	0.77 (0.67–0.90)	6.50E-04	0.91 (0.67–1.24)	.5697	0.80 (0.70–0.91)	8.94E-04	–	.3368
rs78344309	PEX14	1	T	0.070	0.81 (0.72–0.92)	9.99E-04	0.87 (0.69–1.10)	.2530	0.83 (0.74–0.92)	5.67E-04	–	.6135
rs1515496	TP63	3	G	0.389	0.88 (0.84–0.92)	3.50E-08	1.05 (0.94–1.17)	.3907	0.89 (0.85–0.93)	6.27E-08	++	.1725
rs35389543	TP63	3	C	0.099	1.17 (1.08–2.6)	1.48E-04	1.15 (0.99–1.34)	.0727	1.16 (1.08–1.25)	2.74E-05	–	.8619
rs9882798	TP63	3	A	0.096	1.17 (1.08–1.26)	1.39E-04	1.05 (0.90–1.22)	.5464	1.14 (1.06–1.22)	2.61E-04	++	.2141

Note: The *TP63*_{rs1515496} SNPs (or other SNPs in strong LD) is a well-established susceptibility markers for PDAC, $p < .05$ in bold.

Abbreviations: A1, effect-allele; SNP, single nucleotide polymorphism.

^aMeta-analysis: PanScan + PanC4 + FinnGen; FinnGen releases DF10 according to a random effect model.

TABLE 2 Meta-analysis of the association between the BID SNP and PDAC risk.

SNP	Gene	Chr.	EA	MAF	PanScan + PanC4 (n = 15,776)		FinnGen ^a (n = 314,924)		PANDORA (n = 6,980)		Meta-analysis (n = 337,680)		
					OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P _{Het}	
rs9604789	BID	22	A	0.02	1.33 (1.13–1.56)	4.70E-04	1.34 (1.07–1.68)	.0107	1.19 (0.89–1.60)	.251	1.31 (1.16–1.47)	9.674E-06	.7868

Note: $p < .05$ in bold.

Abbreviations: SNP, single nucleotide polymorphism; EA, effect allele; MAF, minor allele frequency according to the 1000genome project.

testing (with a threshold of $p_{\text{Bonferroni}} = 1.72 \times 10^{-5}$) whereas the $TP63_{rs35389543}$ SNP remained borderline significant.

Given that the $TP63_{rs1515496}$ SNP is a well-established risk marker for PDAC, we investigated, for the first time, its correlation with host immune responses. Of note, we found a potentially interesting correlation of the $TP63_{rs1515496}$ SNP with increased numbers of FOXP3+ Helios+ T regulatory cells ($p = 7.67 \times 10^{-4}$; Figure 2A) and CD45RA+ T regulatory cells ($p = 1.56 \times 10^{-3}$; Figure 2B) but decreased levels of CD4+ T regulatory cells ($p = 7.86 \times 10^{-4}$; Figure 2C). Although these associations did not remain significant after correction for multiple testing ($p_{\text{Bonferroni}} = p = 6.1 \times 10^{-5}$, 0.05/9SNPs/91 blood-derived cell populations), these results, together with our genetic findings, might suggest a modest but still functional effect of the $TP63$ locus on determining PDAC risk by regulating absolute numbers of specific subpopulations of regulatory T cells.

Interestingly, we could not find significant correlations between the BID and $TP63$ variants and levels of circulating inflammatory proteins or steroid hormones, which also suggests that these loci do not impact PDAC risk through the modulation of circulating hormone and inflammatory protein levels. However, further investigation into these aspects is warranted to fully understand their roles in PDAC development.

4 | DISCUSSION

This study comprehensively evaluated the role of autophagy-related variants in modulating PDAC risk in three large and independent cohorts including a total of 13,215 PDAC cases and 270,274 healthy controls. The meta-analysis of these European populations identified for the first time that the $BID_{rs9604789}$ SNP was significantly associated with an increased risk of PDAC. This association remained significant after Bonferroni correction (multiple testing). The BID gene (BH3 Interacting Domain Death Agonist) is located on chromosome 22 and it encodes for a Bcl-2 family member that promotes autophagy-mediated cell death and apoptosis through different mechanisms involving caspase-8, but also Bak and Bax proteins.^{58–60} Interestingly, it has been proposed that BID also acts as a mediator in modulating the autophagic flux and host immune responses,^{61,62} which underlines the central role of this gene in tumorigenesis. In this regard, it has been described that the $BID_{rs9604789}$ SNP alters binding motifs for multiple transcription factors including NFκB, POL2, TAF1, TCF12, EGR1, GABP, TBP, POL24H8 and PAX5N19 that are very well-known regulators of key immune processes involving multiple immune cell types.⁶³ Furthermore, it has been shown that the $BID_{rs9604789}$ SNP affect chromatin states and modulates histone marks in multiple primary immune cell types,⁵⁷ which might suggest a role of this SNP in modulating BID expression in specific immune cells. Likewise, it has been reported that the BID protein interacts with NOD1, NOD2 and IKK complex to promote the activation of NFκB and the induction of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. Previous studies have reported that the constitutive activation of ERK/MAPK signaling pathway (resulting from

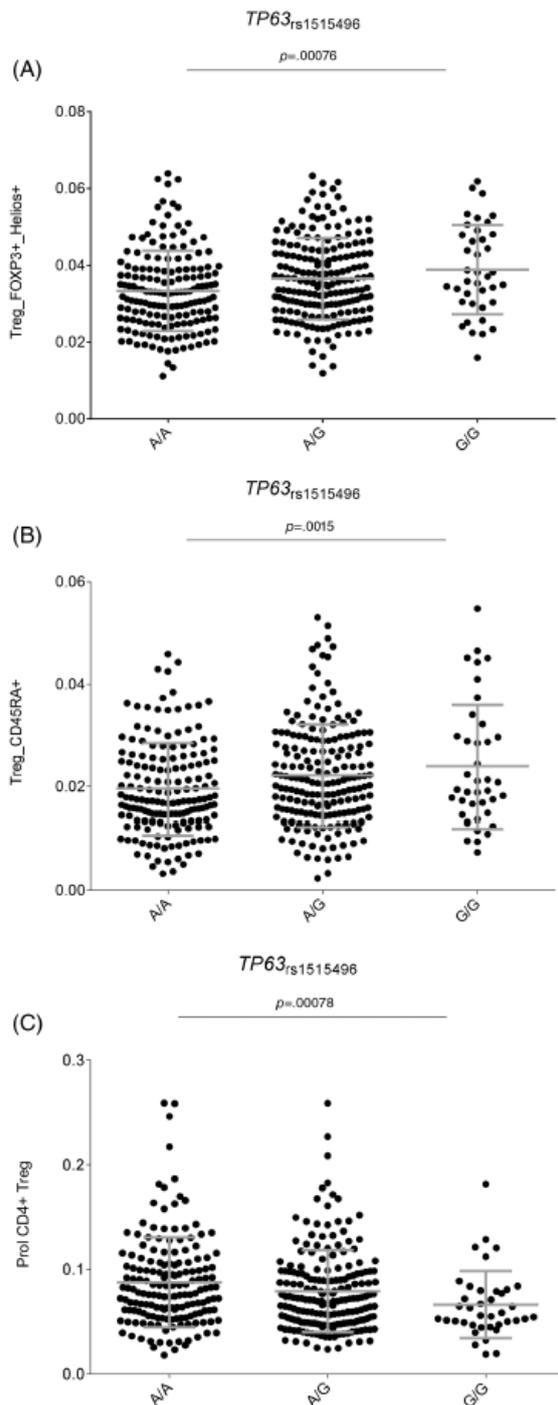


FIGURE 2 (A–C) Correlation of the *TP63*_{rs1515496} SNP with numbers of specific T regulatory T cell subsets.

KRAS mutation) has a relevant role in modulating autophagy, which confirms that *BID* is an autophagy regulator gene that has a relevant role in PDAC.

This activation is linked to macrophage cell survival⁶⁴ and it is independent of the *BID*-induced apoptosis.⁶¹ Furthermore, it has been demonstrated that macrophages from *BID*^{-/-} mice are markedly defective in the production of IL6 and TNF α after stimulation with a NOD2 agonist,⁶¹ which suggests that any disruption of *BID* function might modulate cytokine production. In agreement with these findings, it has been reported that different mutant forms of the *BID* gene affecting protein phosphorylation regulated IL-6 production after stimulation of macrophages with muramyl-dipeptide, a NOD2 agonist.⁶⁵ Importantly, it has been also shown that *BID* modulates myeloid homeostasis and tumor suppression⁶⁶ and acts along with *BIM* to regulate T cell expansion following acute and persistent infection.⁶² Therefore, considering the above information, it seems plausible to suggest that the *BID*_{rs9604789} SNP might dysregulate *BID*-dependent autophagy, host innate immune responses and survival of macrophages and T cells and, thereby, influence cancer development. However, although tempting, we could not demonstrate the immunological role of this marker to modulate PDAC risk as our functional experiments did not show any significant effect on cytokine production, absolute numbers of blood-derived cell populations and serum inflammatory mediators.

Considering these results, it seems more plausible to suggest that the role of *BID*_{rs9604789} SNP in modulating the risk of PDAC is mediated by its effect on the modulating of autophagy-mediated cell death and/or apoptosis.⁶⁷ In support of this hypothesis, Li et al. (1998) reported that *BID* is a specific proximal substrate of *CASP8* in the Fas apoptotic signaling pathway that mediates mitochondrial damage induced by *CASP8*.⁶⁸ Conversely, although *BID* is mainly known as a pro-apoptotic protein,⁶⁵ it has been reported that it may also lead to the inhibition of apoptosis and induce a shift of toward autophagy-mediated cell death especially in cells resistant to apoptosis.⁶⁹ In addition, it has been reported that *BID* is a target gene of *p53*,⁷⁰ which suggests its implication in the regulation of autophagy-dependent cell death. However, despite the above-reported information, it is difficult to draw definitive conclusions on how the *BID*_{rs9604789} SNP within the *BID* gene might determine *BID* function and, thereby, cancer risk. Therefore, additional functional studies are now warranted to decipher the specific role of this SNP in modulating the risk of PDAC.

Besides the identification of the *BID* SNP in determining PDAC risk, the meta-analysis of the three cohorts validated results from previous studies demonstrating that autophagy-related variants within the *TP63* locus (or specific SNPs in strong LD with them) are susceptibility biomarkers for PDAC risk.^{16,45,71} The strongest effect was found for the *TP63*_{rs1515496} SNP that survived correction for multiple testing ($p = 5.0 \times 10^{-8}$). Although the association of the *TP63*_{rs1515496} SNP with PDAC risk has been previously established using among others PanScan, PanC4 and PANDoRA populations,^{45,72} its specific biological function has not been completely elucidated. In this regard, we could demonstrate that the *TP63*_{rs1515496} SNP was associated with increased absolute numbers of FOXP3+ Helios+ T regulatory cells, and CD45RA+ T regulatory cells, but also with decreased numbers of CD4+ T regulatory cells, the latter being a subset of regulatory T cells with potentially suppressing immunological activities. These findings

are in agreement with previous studies demonstrating that higher counts of T regulatory cells were significantly associated with an increased risk of PDAC in participants diagnosed within the first 5 years of follow-up⁷³ and even with poor prognosis.^{74,75} Furthermore, functional data from Haploreg showed that the *TP63*_{r31515496} SNP alters binding sites for FOXA1 and CTCF transcription factors, which are involved in modulating T regulatory cell numbers and, therefore, host immune responses.⁶³ In addition to this, it has also been shown that *TP63* is frequently overexpressed in PDAC tissues⁷⁶ and that its expression correlates with disease aggressiveness.⁷⁶ Likewise, besides the role of the *TP63*_{r31515496} variant in determining absolute numbers of regulatory T cell subsets and host immune responses, it is conceivable that this intronic variant (or any other polymorphism in strong LD with it) could influence *TP63* function through alteration of splicing sites and thus give rise to functionally different *TP63* isoforms. In this regard, a recent study has demonstrated that whereas the TAp63 isoform induces cell death and cell cycle arrest with tumor suppressor features,⁶⁵ the DNp63 isoform, which is the most common isoform in PDAC cell lines, has an opposite effect inducing pancreatic cancer growth, motility and invasion.^{77,78}

Finally, even though the association of genetic markers within the *MAP1LC3B*, *ERBB2*, *MTOR*, *PEX14* and *NRB1* loci did not reach the multiple testing significance threshold and, therefore, were not advanced for replication in the PANDORA cohort, we think that they are potentially interesting markers that need to be further analyzed in future studies. In particular, it has been reported that the *MAP1LC3B* and *ERBB2* genes, which showed SNPs associated with PDAC risk close to the Bonferroni significance threshold, may play a role in modulating tumor cell survival and resistance to treatments. Rouschop et al. (2010) demonstrated that the unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia by regulating *MAP1LC3B*, which is involved in phagophore expansion and autophagosome formation.⁷⁹ In addition, expression of the *MAP1LC3B* protein in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) has been linked to poor survival in PDAC patients,⁸⁰ suggesting its involvement in modulating adaptive immune resistance of tumor cells.

Similarly, *ERBB2* has also been consistently implicated in PDAC onset and patient survival. Previous studies have demonstrated that this gene is frequently amplified in PDAC patients,⁸¹ and its oncogenic effect is mediated not only by gene amplification but also by overexpression,⁸² highlighting the value of studying this component from a genetic perspective. Additionally, Ortega et al. (2015) recently demonstrated that *ERBB2* is upregulated in a high proportion of PDAC patients,⁸³ suggesting its involvement not only in disease onset but also in disease progression⁸⁴⁻⁸⁶ and patient survival.⁸³ However, further studies are needed to delineate the precise roles of *MAP1LC3B* and *ERBB2* in PDAC pathogenesis, as some previous studies have indicated a lack of influence of these genes on disease progression.^{87,88}

This study has both strengths and limitations. The most important strengths of our study are the comprehensive analysis of autophagy-related SNPs and the inclusion of three large independent populations of European ancestry for a total of 276,608 study participants. Furthermore, we comprehensively analyzed the functional impact of

autophagy-related SNPs in modulating host immune responses, absolute numbers of blood-derived cell populations, serum and plasma metabolites, and steroid hormones in a large study of healthy subjects ascertained through the HFGP. However, this study also has limitations. Even though the 5 kb upstream and 3 kb downstream range used to select SNPs is generally sufficient to capture most relevant variants, including those in promoter regions and untranslated regions that can impact gene function, we acknowledge that regulatory elements, such as enhancers and repressors, can exist outside these regions. Therefore, our study might miss some potentially interesting and functional markers that affect the regulation of autophagy genes. Another limitation of our study is that it included only populations of European ancestry, which restricted the translation of the above-reported results to other ethnicity groups. Although we attempted to validate the association of the *BID* SNP with PDAC risk in the JaPAN consortium, this cohort did not have genotyping information of the *BID* marker (or its proxies).⁸⁹ Additionally, the lack of environmental variables in the PANDORA database prevented us from conducting gene-environmental interaction analyses to explore the relationship between genetic factors and environmental influences in PDAC development.

5 | CONCLUSION

In summary, our study has identified, for the first time, the association of the *BID*_{r39604789} SNP with an increased risk of developing the disease. In addition, it has confirmed the association of *TP63* SNPs with the risk of developing PDAC. This study points to a functional role of the *BID* and *TP63* loci in modulating PDAC onset likely through the regulation of autophagy and host immune responses mediated by different subsets of T regulatory cells. Finally, this work has underlined the need of additional studies to elucidate the functional role of the *MAP1LC3B*, *ERBB2*, *MTOR*, *PEX14* and *NRB1* loci to determine PDAC risk.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Fernando Gálvez-Montosa: Formal analysis; investigation; resources; writing – original draft. **Giulia Peduzzi:** Data curation; formal analysis; investigation; resources; writing – original draft. **José Manuel Sánchez-Maldonado:** Formal analysis; investigation; writing – original draft. **Rob ter Horst:** Data curation; formal analysis; investigation; resources; writing – review and editing. **Antonio J. Cabrera-Serrano:** Formal analysis; investigation; writing – review and editing. **Manuel Gentiluomo:** Resources; writing – review and editing. **Angelica Macaudo:** Resources; writing – review and editing. **Natalia Luque:** Resources; writing – review and editing. **Pelín Únal:** Resources; writing – review and editing. **Francisco José García-Verdejo:** Resources; writing – review and editing. **Yang Li:** Resources; writing – review and editing. **José Antonio López López:** Resources; writing – review and editing. **Angelika Stein:** Resources; writing – review and editing. **H. Bas Bueno-de-Mesquita:** Resources; writing – review and editing. **Paolo Giorgio Arcidiacono:** Resources; writing – review and editing.

Dalila Luciola Zanette: Resources; writing – review and editing. **Christoph Kahlert:** Resources; writing – review and editing. **Francesco Perri:** Resources; writing – review and editing. **Pavel Soucek:** Resources; writing – review and editing. **Renata Talar-Wojnarowska:** Resources; writing – review and editing. **George E. Theodoropoulos:** Resources; writing – review and editing. **Jakob R. Izbicki:** Resources; writing – review and editing. **Hussein Tamás:** Resources; writing – review and editing. **Hanneke Van Laarhoven:** Resources; writing – review and editing. **Gennaro Nappo:** Resources; writing – review and editing. **Maria Chiara Petrone:** Resources; writing – review and editing. **Martin Lovecek:** Resources; writing – review and editing. **Roel C. H. Vermeulen:** Resources; writing – review and editing. **Kestutis Adamonis:** Resources; writing – review and editing. **Fernando Jesus Reyes-Zurita:** Resources; writing – review and editing. **Bernd Holleczek:** Resources; writing – review and editing. **Jolanta Sumskiene:** Resources; writing – review and editing. **Beatrice Mohelniková-Duchová:** Resources; writing – review and editing. **Rita T. Lawlor:** Resources; writing – review and editing. **Raffaele Pezzilli:** Resources; writing – review and editing. **Mateus Nobrega Aoki:** Resources; writing – review and editing. **Claudio Pasquali:** Resources; writing – review and editing. **Vitalija Petrenkiene:** Resources; writing – review and editing. **Daniela Basso:** Resources; writing – review and editing. **Stefania Bunduc:** Resources; writing – review and editing. **Annalisa Comandatore:** Resources; writing – review and editing. **Hermann Brenner:** Resources; writing – review and editing. **Stefano Emmini:** Resources; writing – review and editing. **Giuseppe Vanella:** Resources; writing – review and editing. **Mara R. Goetz:** Resources; writing – review and editing. **Livia Archibugi:** Resources; writing – review and editing. **Maurizio Lucchesi:** Resources; writing – review and editing. **Falk Guntac Uzunoglu:** Resources; writing – review and editing. **Olivier Busch:** Resources; writing – review and editing. **Anna Caterina Milanetto:** Resources; writing – review and editing. **Marta Puzzono:** Resources; writing – review and editing. **Juozas Kupcinskis:** Resources; writing – review and editing. **Luca Morelli:** Resources; writing – review and editing. **Cosimo Sperti:** Resources; writing – review and editing. **Silvia Carrara:** Resources; writing – review and editing. **Gabriele Capurso:** Resources; writing – review and editing. **Casper H. J. van Eijck:** Resources; writing – review and editing. **Martin Oliverius:** Resources; writing – review and editing. **Susanne Roth:** Resources; writing – review and editing. **Francesca Tavano:** Resources; writing – review and editing. **Rudolf Kaaks:** Resources; writing – review and editing. **Andrea Szentesi:** Resources; writing – review and editing. **Ludmila Vodickova:** Resources; writing – review and editing. **Claudio Luchini:** Resources; writing – review and editing. **Ben Schöttker:** Resources; writing – review and editing. **Stefano Landi:** Resources; writing – review and editing. **Orsolya Dohan:** Resources; writing – review and editing. **Matteo Tacelli:** Resources; writing – review and editing. **William Greenhalf:** Resources; writing – review and editing. **Maria Gazouli:** Resources; writing – review and editing. **John P. Neoptolemos:** Resources; writing – review and editing. **Giulia Martina Cavestro:** Resources; writing – review and editing. **Ugo Boggi:** Resources; writing – review and editing. **Anna Latiano:** Resources; writing – review and editing. **Péter Hegyi:** Resources;

writing – review and editing. **Laura Ginocchi:** Resources; writing – review and editing. **Mihai G. Netea:** Resources; writing – review and editing. **Pedro Sánchez-Rovira:** Resources; writing – review and editing. **Federico Canzian:** Conceptualization; investigation; resources; writing – review and editing. **Daniele Campa:** Conceptualization; funding acquisition; resources; writing – original draft; writing – review and editing. **Juan Sainz:** Conceptualization; formal analysis; funding acquisition; investigation; resources; writing – original draft; writing – review and editing.

AFFILIATIONS

¹Department of Medical Oncology, Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain

²Department of Biology, University of Pisa, Pisa, Italy

³Department of Biochemistry and Molecular Biology I, University of Granada, Granada, Spain

⁴Genomic Oncology Area, GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer/University of Granada/Andalusian Regional Government, PTS, Granada, Spain

⁵Instituto de Investigación Biosanitaria Ibs.Granada, Granada, Spain

⁶Genomic Epidemiology Group, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

⁷Department of Internal Medicine and Radboud Center for Infectious Diseases, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

⁸CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria

⁹National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands

¹⁰Pancreatico/Biliary Endoscopy & Endosonography Division, Pancreas Translational & Clinical Research Center, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

¹¹Laboratory for Applied Science and Technology in Health, Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Curitiba, Brazil

¹²Department of General Surgery, University of Heidelberg, Heidelberg, Baden-Württemberg, Germany

¹³Division of Gastroenterology and Research Laboratory, Fondazione IRCCS “Casa Sollievo della Sofferenza” Hospital, Foggia, Italy

¹⁴Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

¹⁵Department of Digestive Tract Diseases, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

¹⁶Colorectal Unit, First Department of Propaedeutic Surgery, Medical School of National and Kapodistrian University of Athens, Hippocraton General Hospital, Athens, Greece

¹⁷Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

¹⁸Center for Translational Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

¹⁹Division of Pancreatic Diseases, Heart and Vascular Center, Semmelweis University, Budapest, Hungary

²⁰Department of Medical Oncology, Amsterdam UMC location University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

²¹Cancer Center Amsterdam, Imaging and Biomarkers, Amsterdam, The Netherlands

²²Pancreatic Unit, IRCCS Humanitas Research Hospital, Milan, Italy

²³Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Milan, Italy

²⁴Department of Surgery I, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

²⁵University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands

²⁶Gastroenterology Department and Institute for Digestive Research, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

²⁷Saarland Cancer Registry, Saarbrücken, Germany

²⁸Division of Clinical Epidemiology and Aging Research, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

²⁹Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

³⁰ARC-Net Centre for Applied Research on Cancer University of Verona, Verona, Italy

³¹Department of Diagnostics and Public Health, Section of Pathology, University of Verona, Verona, Italy

³²Potenza County Medical Association, Potenza, Italy

³³Department of DISCOG, University of Padova, Padova, Italy

³⁴Department of DIMED, Laboratory Medicine, University of Padova, Padova, Italy

³⁵Carol Davila University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania

³⁶Digestive Diseases and Liver Transplantation Center, Fundeni Clinical Institute, Bucharest, Romania

³⁷General Surgery Unit, Department of Translational Research and New Technologies in Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy

³⁸German Cancer Consortium (DKTK), German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

³⁹Digestive and Liver Disease Unit, S Andrea Hospital, Rome, Italy

⁴⁰Pancreas Translational and Clinical Research Center, Pancreato-Biliary Endoscopy and Endoscopic Ultrasound, San Raffaele Scientific Institute IRCCS, Milan, Italy

⁴¹Oncologia Massa Carrara, Azienda USL Toscana Nord Ovest, Carrara, Italy

⁴²Department of Medical Oncology, Amsterdam UMC Location University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

⁴³Gastroenterology and Gastrointestinal Endoscopy Unit, Vita-Salute San Raffaele University, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

⁴⁴Department of Gastroenterology, IRCCS Humanitas Research Hospital – Endoscopic Unit, Milan, Italy

⁴⁵Department of Surgery, Erasmus MC University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

⁴⁶Department of Surgery, University Hospital Kralovske Vinohrady, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

⁴⁷Division of Cancer Epidemiology, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

⁴⁸Institute for Translational Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

⁴⁹Department of Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

⁵⁰Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

⁵¹Faculty of Medicine and Biomedical Center in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic

⁵²Department of Engineering for Innovation in Medicine, University of Verona, Verona, Italy

⁵³Institute for Health Research Liverpool Pancreas Biomedical Research Unit, University of Liverpool, Liverpool, UK

⁵⁴Department of Basic Medical Science, Laboratory of Biology, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

⁵⁵Division of General and Transplant Surgery, Pisa University Hospital, Pisa, Italy

⁵⁶János Szentágotthai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary

⁵⁷Centre for Individualised Infection Medicine (CiIM) & TWINCORE, joint Ventures Between the Helmholtz-Centre for Infection Research (HZI) and the Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany

⁵⁸Department for Immunology & Metabolism, Life and Medical Sciences Institute (LIMES), University of Bonn, Bonn, Germany

⁵⁹Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, Spain

FUNDING INFORMATION

This work has been funded by multiple institutions: Italian Minister of Health, Ricerca Corrente program 2022-2024, to Fondazione IRCCS “Casa Sollievo della Sofferenza” Hospital, San Giovanni Rotondo (FG), Italy; National Institute for Cancer Research (Programme EXCELES, No. LX22NPO5102), Czech Republic Ministry of Health (GACR 21-27902 and AZV NU21-03-00145) and Charles University (UNCE/MED/006); Associazione Italiana Ricerca Cancro (AIRC IG n. 26343); The Instituto de Salud Carlos III and FEDER (Madrid, Spain; PI17/02256 and PI20/01845), Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades and FEDER (PY20/01282) and the voluntary economical contribution of patients.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

All authors have no competing interests to disclose.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The genotype data used in the present study come from three pancreatic cancer GWAS datasets downloaded from the NCBI database of genotypes and phenotypes (dbGaP; study accession numbers phs000206.v5.p3 and phs000648.v1.p1; project reference #12644), namely PanScan I, PanScan II and PanC4. Genotyping data of the genetic markers analyzed in the PANDORA cohort are available on request from the corresponding author. Functional data used in this project have been meticulously catalogued and archived in the BBMRI-NL data infrastructure (<https://hfgp.bbMRI.nl/>) using the

MOLGENIS open-source platform for scientific data. This allows flexible data querying and download, including sufficiently rich metadata and interfaces for machine processing (R statistics, REST API) and using FAIR principles to optimize Findability, Accessibility, Interoperability and Reusability. Further information is available from the corresponding author upon request.

ETHICS STATEMENT

Each participant in the PanScan and PanC4 studies obtained approval from the responsible institutional review board (IRB) and IRB certification permitting data sharing in accordance with the NIH Policy for sharing of Data Obtained in NIH-Supported or NIH-Conducted Genome Wide Association Studies. The PANDoRA study protocol was approved by the Ethics Commission of the Medical Faculty of the University of Heidelberg (S-565/2015, last update on April 3, 2017). In accordance with the Declaration of Helsinki, written informed consent was obtained from each participant. The PANDoRA cohort was set up in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. Ethical approval for this study was obtained from each participating institution in PANDoRA and all participating subjects provided written informed consent (Data S1).^{90,91} The HFGP study was also approved by the Arnhem-Nijmegen Ethical Committee (no. 42561.091.12) and biological specimens were collected after informed consent was obtained.

ORCID

Manuel Gentiluomo  <https://orcid.org/0000-0002-0366-9653>

Pavel Soucek  <https://orcid.org/0000-0002-4294-6799>

Hermann Brenner  <https://orcid.org/0000-0002-6129-1572>

Francesca Tavano  <https://orcid.org/0000-0002-8831-7349>

Rudolf Kaaks  <https://orcid.org/0000-0003-3751-3929>

Ben Schöttker  <https://orcid.org/0000-0002-1217-4521>

Stefano Landi  <https://orcid.org/0000-0001-8364-6357>

Maria Gazouli  <https://orcid.org/0000-0002-3295-6811>

Federico Canzian  <https://orcid.org/0000-0002-4261-4583>

Daniele Campa  <https://orcid.org/0000-0003-3220-9944>

Juan Sainz  <https://orcid.org/0000-0002-9355-2423>

TWITTER

Juan Sainz  [JuanSainzUGR](https://twitter.com/JuanSainzUGR)

REFERENCES

- Kleeff J, Korc M, Apte M, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16022.
- Hu JX, Zhao CF, Chen WB, et al. Pancreatic cancer: a review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*. 2021;27:4298-4321.
- Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2014;371:2140-2141.
- De La Cruz MS, Young AP, Ruffin MT. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am Fam Physician*. 2014;89:626-632.
- Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023;73:17-48.
- Simoes PK, Olson SH, Saldia A, Kurtz RC. Epidemiology of pancreatic adenocarcinoma. *Chin Clin Oncol*. 2017;6:24.
- Lu Y, Gentiluomo M, Lorenzo-Bermejo J, et al. Mendelian randomisation study of the effects of known and putative risk factors on pancreatic cancer. *J Med Genet*. 2020;57:820-828.
- Peduzzi G, Felici A, Pellungrini R, et al. Analysis of exposome and genetic variability suggests stress as a major contributor for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Liver Dis*. 2023;56:1054-1063.
- Galeotti AA, Gentiluomo M, Rizzato C, et al. Polygenic and multifactorial scores for pancreatic ductal adenocarcinoma risk prediction. *J Med Genet*. 2021;58:369-377.
- Pistoni L, Gentiluomo M, Lu Y, et al. Associations between pancreatic expression quantitative traits and risk of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2021;42:1037-1045.
- Lu Y, Corradi C, Gentiluomo M, et al. Association of genetic variants affecting microRNAs and pancreatic cancer risk. *Front Genet*. 2021;12:693933.
- Gentiluomo M, Canzian F, Nicolini A, Gemignani F, Landi S, Campa D. Germline genetic variability in pancreatic cancer risk and prognosis. *Semin Cancer Biol*. 2022;79:105-131.
- Nodari Y, Gentiluomo M, Mohelnikova-Duchonova B, et al. Genetic and non-genetic risk factors for early-onset pancreatic cancer. *Dig Liver Dis*. 2023;55:1417-1425.
- Corradi C, Lencioni G, Gentiluomo M, et al. Polymorphic variants involved in methylation regulation: a strategy to discover risk loci for pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Med Genet*. 2023;60:980-986.
- Giaccherini M, Farinella R, Gentiluomo M, et al. Association between a polymorphic variant in the CDKN2B-AS1/ANRIL gene and pancreatic cancer risk. *Int J Cancer*. 2023;153:373-379.
- Campa D, Matarazzi M, Greenhalf W, et al. Genetic determinants of telomere length and risk of pancreatic cancer: a PANDoRA study. *Int J Cancer*. 2019;144:1275-1283.
- Luo W, Tao J, Zheng L, Zhang T. Current epidemiology of pancreatic cancer: challenges and opportunities. *Chin J Cancer Res*. 2020;32:705-719.
- Nipp R, Tramontano AC, Kong CY, et al. Disparities in cancer outcomes across age, sex, and race/ethnicity among patients with pancreatic cancer. *Cancer Med*. 2018;7:525-535.
- Yun Z, Zhichao J, Hao Y, et al. Targeting autophagy in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2017;59:97-104.
- Dykstra KM, Allen C, Born EJ, Tong H, Holstein SA. Mechanisms for autophagy modulation by isoprenoid biosynthetic pathway inhibitors in multiple myeloma cells. *Oncotarget*. 2015;6:41535-41549.
- Garcia Ruiz O, Sanchez-Maldonado JM, Lopez-Nevot MA, et al. Autophagy in hematological malignancies. *Cancers*. 2022;14:14.
- Eng CH, Wang Z, Tkach D, et al. Macroautophagy is dispensable for growth of KRAS mutant tumors and chloroquine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:182-187.
- Yang S, Wang X, Contino G, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*. 2011;25:717-729.
- Grasso D, Garcia MN, Iovanna JL. Autophagy in pancreatic cancer. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:760498.
- Dengjel J, Schoor O, Fischer R, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:7922-7927.
- Yamamoto K, Venida A, Yano J, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature*. 2020;581:100-105.
- Gillson J, Abd El-Aziz YS, Leck LYW, et al. Autophagy: a key player in pancreatic cancer progression and a potential drug target. *Cancers*. 2022;14:14.
- Li J, Chen X, Kang R, Zeh H, Klionsky DJ, Tang D. Regulation and function of autophagy in pancreatic cancer. *Autophagy*. 2021;17:3275-3296.

29. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:528-542.
30. Levy JM, Thorburn A. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacol Ther*. 2011;131:130-141.
31. Stromnes IM, DelGiorno KE, Greenberg PD, Hingorani SR. Stromal reengineering to treat pancreas cancer. *Carcinogenesis*. 2014;35:1451-1460.
32. Zhang W, He R, Yang W, et al. Autophagic Schwann cells promote perineural invasion mediated by the NGF/ATG7 paracrine pathway in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41:48.
33. Gorgulu K, Diakopoulos KN, Ai J, et al. Levels of the autophagy-related 5 protein affect progression and metastasis of pancreatic tumors in mice. *Gastroenterology*. 2019;156:203-217.
34. Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Fok J, Kondo Y, Lopez-Berestein G. Tissue transglutaminase inhibits autophagy in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2007;5:241-249.
35. Karasic TB, O'Hara MH, Loaiza-Bonilla A, et al. Effect of gemcitabine and nab-paclitaxel with or without hydroxychloroquine on patients with advanced pancreatic cancer: a phase 2 randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2019;5:993-998.
36. Wolpin BM, Rubinson DA, Wang X, et al. Phase II and pharmacodynamic study of autophagy inhibition using hydroxychloroquine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Oncologist*. 2014;19:637-638.
37. Sainz J, Garcia-Verdejo FJ, Martinez-Bueno M, et al. Polymorphisms within autophagy-related genes influence the risk of developing colorectal cancer: a meta-analysis of four large cohorts. *Cancers*. 2021;13:1258.
38. Clavero E, Sanchez-Maldonado JM, Macaudo A, et al. Polymorphisms within autophagy-related genes as susceptibility biomarkers for multiple myeloma: a meta-analysis of three large cohorts and functional characterization. *Int J Mol Sci*. 2023;24:8500.
39. Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ. Autophagy and the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:611-646.
40. Jiang GM, Tan Y, Wang H, et al. The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy. *Mol Cancer*. 2019;18:17.
41. Bakker OB, Aguirre-Gamboa R, Sanna S, et al. Integration of multi-omics data and deep phenotyping enables prediction of cytokine responses. *Nat Immunol*. 2018;19:776-786.
42. Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2009;41:986-990.
43. Petersen GM, Amundadottir L, Fuchs CS, et al. A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat Genet*. 2010;42:224-228.
44. Wolpin BM, Rizzato C, Kraft P, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2014;46:994-1000.
45. Childs EJ, Mocci E, Campa D, et al. Common variation at 2p13.3, 3q29, 7p13 and 17q25.1 associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2015;47:911-916.
46. Khurana E, Fu Y, Colonna V, et al. Integrative annotation of variants from 1092 humans: application to cancer genomics. *Science*. 2013;342:1235587.
47. Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491:56-65.
48. Romo L, Findlay SD, Burge CB. Regulatory features aid interpretation of 3'UTR variants. *Am J Hum Genet*. 2024;111:350-363.
49. Das S, Forer L, Schonherr S, et al. Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet*. 2016;48:1284-1287.
50. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2006;38:904-909.
51. Willer CJ, Li Y, Abecasis GR. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics*. 2010;26:2190-2191.
52. Manuel Sanchez-Maldonado J, Martinez-Bueno M, Canhao H, et al. NFKB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: results from the REPAIR consortium. *Sci Rep*. 2020;10:4316.
53. Sanchez-Maldonado JM, Cabrera-Serrano AJ, Chattopadhyay S, et al. GWAS-identified variants for obesity do not influence the risk of developing multiple myeloma: a population-based study and meta-analysis. *Int J Mol Sci*. 2023;24:6029.
54. Balduzzi S, Rucker G, Schwarzer G. How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial. *Evid Based Ment Health*. 2019;22:153-160.
55. Li Y, Oosting M, Smeekens SP, et al. A functional genomics approach to understand variation in cytokine production in humans. *Cell*. 2016;167:1099-1110.
56. Rios-Tamayo R, Lupianez CB, Campa D, et al. A common variant within the HNF1B gene is associated with overall survival of multiple myeloma patients: results from the IMMENSE consortium and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7:59029-59048.
57. Westra HJ, Peters MJ, Esko T, et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat Genet*. 2013;45:1238-1243.
58. Xi H, Wang S, Wang B, et al. The role of interaction between autophagy and apoptosis in tumorigenesis (review). *Oncol Rep*. 2022;48:208.
59. Wang W, Li J, Tan J, et al. Endonuclease G promotes autophagy by suppressing mTOR signaling and activating the DNA damage response. *Nat Commun*. 2021;12:476.
60. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006;12:440-450.
61. Yeretsian G, Correa RG, Doiron K, et al. Non-apoptotic role of BID in inflammation and innate immunity. *Nature*. 2011;474:96-99.
62. Masson F, Kupresanin F, Mount A, Strasser A, Belz GT. Bid and Bim collaborate during induction of T cell death in persistent infection. *J Immunol*. 2011;186:4059-4066.
63. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:D877-D881.
64. Luo W, Li J, Zhang D, et al. Bid mediates anti-apoptotic COX-2 induction through the IKKbeta/NFkappaB pathway due to 5-MCDE exposure. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010;10:96-106.
65. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. 1996;10:2859-2869.
66. Zinkel SS, Ong CC, Ferguson DO, et al. Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev*. 2003;17:229-239.
67. Bertran-Alamillo J, Gimenez-Capitan A, Roman R, et al. BID expression determines the apoptotic fate of cancer cells after abrogation of the spindle assembly checkpoint by AURKB or TTK inhibitors. *Mol Cancer*. 2023;22:110.
68. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998;94:491-501.
69. Lamparska-Przybyls M, Gajkowska B, Motyl T. Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. *J Physiol Pharmacol*. 2005;56(Suppl 3):159-179.
70. Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*. 2002;4:842-849.
71. Xu X, Qian D, Liu H, et al. Genetic variants in the liver kinase B1-AMP-activated protein kinase pathway genes and pancreatic cancer risk. *Mol Carcinog*. 2019;58:1338-1348.

72. Chen F, Roberts NJ, Klein AP. Inherited pancreatic cancer. *Chin Clin Oncol*. 2017;6:58.
73. Katzke VA, Le Cornet C, Mahfouz R, et al. Are circulating immune cells a determinant of pancreatic cancer risk? A prospective study using epigenetic cell count measures. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021;30:2179-2187.
74. Liu C, Cheng H, Luo G, et al. Circulating regulatory T cell subsets predict overall survival of patients with unresectable pancreatic cancer. *Int J Oncol*. 2017;51:686-694.
75. Cheng H, Luo G, Lu Y, et al. The combination of systemic inflammation-based marker NLR and circulating regulatory T cells predicts the prognosis of resectable pancreatic cancer patients. *Pancreatology*. 2016;16:1080-1084.
76. Ito Y, Takeda T, Wakasa K, Tsujimoto M, Sakon M, Matsuura N. Expression of p73 and p63 proteins in pancreatic adenocarcinoma: p73 overexpression is inversely correlated with biological aggressiveness. *Int J Mol Med*. 2001;8:67-71.
77. Danilov AV, Neupane D, Nagaraja AS, et al. DeltaNp63alpha-mediated induction of epidermal growth factor receptor promotes pancreatic cancer cell growth and chemoresistance. *PLoS One*. 2011;6:e26815.
78. Flores ER, Sengupta S, Miller JB, et al. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*. 2005;7:363-373.
79. Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest*. 2010;120:127-141.
80. Zhang X, Lao M, Yang H, et al. Targeting cancer-associated fibroblast autophagy renders pancreatic cancer eradicable with immunotherapy by inhibiting adaptive immune resistance. *Autophagy*. 2024;20:1314-1334.
81. Omar N, Yan B, Salto-Tellez M. HER2: an emerging biomarker in non-breast and non-gastric cancers. *Pathogenesis*. 2015;2:1-9.
82. Meyers N, Gerard C, Lemaigre FP, Jacquemin P. Differential impact of the ERBB receptors EGFR and ERBB2 on the initiation of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2020;10:5241.
83. Ortega MA, Pekarek L, Fraile-Martinez O, et al. Implication of ERBB2 as a predictive tool for survival in patients with pancreatic cancer in histological studies. *Curr Oncol*. 2022;29:2442-2453.
84. Li Z, Shao C, Liu X, et al. Oncogenic ERBB2 aberrations and KRAS mutations cooperate to promote pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Carcinogenesis*. 2020;41:44-55.
85. Shibata W, Kinoshita H, Hikiba Y, et al. Overexpression of HER2 in the pancreas promotes development of intraductal papillary mucinous neoplasms in mice. *Sci Rep*. 2018;8:6150.
86. Gore J, Imasuen-Williams IE, Conteh AM, Craven KE, Cheng M, Korc M. Combined targeting of TGF-beta, EGFR and HER2 suppresses lymphangiogenesis and metastasis in a pancreatic cancer model. *Cancer Lett*. 2016;379:143-153.
87. Stoecklein NH, Luebke AM, Erbersdobler A, et al. Copy number of chromosome 17 but not HER2 amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2004;22:4737-4745.
88. Aumayr K, Soleiman A, Sahara K, et al. HER2 gene amplification and protein expression in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22:146-152.
89. Lin Y, Nakatochi M, Hosono Y, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies GP2 gene risk variants for pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2020;11:3175.
90. Campa D, Rizzato C, Capurso G, et al. Genetic susceptibility to pancreatic cancer and its functional characterisation: the PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium. *Dig Liver Dis*. 2013;45:95-99.
91. Campa D, Gentiluomo M, Stein A, et al. The PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium: ten years' experience of association studies to understand the genetic architecture of pancreatic cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2023;186:104020.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Gálvez-Montosa F, Peduzzi G, Sanchez-Maldonado JM, et al. Polymorphisms within autophagy-related genes as susceptibility biomarkers for pancreatic cancer: A meta-analysis of three large European cohorts and functional characterization. *Int J Cancer*. 2025; 156(2):339-352. doi:10.1002/ijc.35196

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
2. Pourshams A, Sepanlou SG, Ikuta KS, Bisignano C, Safiri S, Roshandel G, et al. The global, regional, and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec 1;4(12):934–47.
3. Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Rimm EB, et al. A Prospective Study of Cigarette Smoking and the Risk of Pancreatic Cancer [Internet]. Available from: <http://archinte.jamanetwork.com/>
4. Batabyal P, Vander Hoorn S, Christophi C, Nikfarjam M. Association of diabetes mellitus and pancreatic adenocarcinoma: A meta-analysis of 88 studies. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(7):2453–62.
5. Carreras-Torres R, Johansson M, Gaborieau V, Haycock PC, Wade KH, Relton CL, et al. The Role of Obesity, Type 2 Diabetes, and Metabolic Factors in Pancreatic Cancer: A Mendelian Randomization Study. *J Natl Cancer Inst*. 2017 Sep 1;109(9).
6. Li D, Morris JS, Liu J, Hassan MM, Day RS, Bondy ML, et al. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA*. 2009 Jun 24;301(24):2553–62.
7. Yuan C, Bao Y, Wu C, Kraft P, Ogino S, Ng K, et al. Prediagnostic body mass index and pancreatic cancer survival. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Nov 20;31(33):4229–34.

8. Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, et al. Alcohol consumption and pancreatic cancer: A pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology*. 2012;23(2):374–82.
9. Arem H, Reedy J, Sampson J, Jiao L, Hollenbeck AR, Risch H, et al. The healthy eating index 2005 and risk for pancreatic cancer in the NIH-AARP study. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Sep 4;105(17):1298–305.
10. Bang UC, Benfield T, Hyldstrup L, Bendtsen F, Beck Jensen JE. Mortality, cancer, and comorbidities associated with chronic pancreatitis: A Danish nationwide matched-cohort study. *Gastroenterology*. 2014;146(4):989-994.e1.
11. Yamada A, Komaki Y, Komaki F, Micic D, Zullow S, Sakuraba A. Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2018 Jun 1;19(6):758–67.
12. Wolpin BM, Kraft P, Gross M, Helzlsouer K, Bueno-de-Mesquita HB, Steplowski E, et al. Pancreatic cancer risk and ABO blood group alleles: Results from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium. *Cancer Res*. 2010 Feb 1;70(3):1015–23.
13. Shindo K, Yu J, Suenaga M, Fesharakizadeh S, Cho C, Macgregor-Das A, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Deleterious Germline Mutations in Patients With Apparently Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017>.
14. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. Vol. 76, *Histopathology*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 182–8.

15. Eroschenko V. Atlas of histology with functional correlations. 13th Edition. Philadelphia: Wolters-Kluwer; 2017.
16. Karoumpalis I, Christodoulou DK. Cystic lesions of the pancreas. Vol. 29, Annals of Gastroenterology. Hellenic Society of Gastroenterology; 2016. p. 155–61.
17. Perri G, Marchegiani G, Frigerio I, Dervenis CG, Conlon KC, Bassi C, et al. Management of Pancreatic Cystic Lesions. Vol. 37, Digestive Surgery. S. Karger AG; 2020. p. 1–9.
18. Bakkevold KE, Arnesjø B, Kambestad B. Carcinoma of the pancreas and papilla of vater: Presenting symptoms, signs, and diagnosis related to stage and tumour site a prospective multicentre trial in 472 patients. Scand J Gastroenterol. 1992;27(4):317–25.
19. Goodman M, Willmann JK, Jeffrey RB. Incidentally discovered solid pancreatic masses: Imaging and clinical observations. Abdom Imaging. 2012 Feb;37(1):91–7.
20. Miura F, Takada T, Amano H, Yoshida M, Furui S, Takeshita K. Diagnosis of pancreatic cancer. Vol. 8, HPB. 2006. p. 337–42.
21. Molina V, Visa L, Conill C, Navarro S, Escudero JM, Auge JM, et al. CA 19-9 in pancreatic cancer: Retrospective evaluation of patients with suspicion of pancreatic cancer. Tumor Biology. 2012;33(3):799–807.
22. Schouten TJ, Daamen LA, Dorland G, van Roessel SR, Groot VP, Besselink MG, et al. Nationwide Validation of the 8th American Joint Committee on Cancer TNM Staging System and Five Proposed Modifications for Resected Pancreatic Cancer. Ann Surg Oncol. 2022 Sep 1;29(9):5988–99.
23. Benson III AB, Lurie RH, Cardin DB, Gabriela Chiorean E, Hutchinson Cancer Center Jared Christensen FA, Chung V, et al. NCCN Guidelines Version 2.2023 Pancreatic Adenocarcinoma Continue NCCN Guidelines Version 2.2023 Pancreatic Adenocarcinoma [Internet]. 2023. Available from: <https://www.nccn.org/home/member->

24. Glanemann M, Shi B, Liang F, Sun XG, Bahra M, Jacob D, et al. Surgical strategies for treatment of malignant pancreatic tumors: Extended, standard or local surgery? Vol. 6, World Journal of Surgical Oncology. 2008.
25. Suker M, Beumer BR, Sadot E, Marthey L, Faris JE, Mellon EA, et al. FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. Lancet Oncol. 2016 Jun 1;17(6):801–10.
26. Janssen QP, Van Dam JL, Doppenberg D, Prakash LR, Van Eijck CHJ, Jarnagin WR, et al. FOLFIRINOX as Initial Treatment for Localized Pancreatic Adenocarcinoma: A Retrospective Analysis by the Trans-Atlantic Pancreatic Surgery Consortium. J Natl Cancer Inst. 2022 May 1;114(5):695–703.
27. 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. 2021 Mar 1;7(3):421–7.
28. Kunzmann V, Siveke JT, Algül H, Goekkurt E, Siegler G, Martens U, et al. Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus nab-paclitaxel plus gemcitabine followed by FOLFIRINOX induction chemotherapy in locally advanced pancreatic cancer (NEOLAP-AIO-PAK-0113): a multicentre, randomised, phase 2 trial. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2021 Feb 1;6(2):128–38.
29. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: The CONKO-001 randomized trial. JAMA. 2013 Oct 9;310(14):1473–81.

30. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017 Mar 11;389(10073):1011–24.
31. Tempero MA, Pelzer U, O EM, Winter J, Oh DY, Li CP, et al. Adjuvant nab-Paclitaxel 1 Gemcitabine in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Results From a Randomized, Open-Label, Phase III Trial. *J Clin Oncol* [Internet]. 2022;41:2007–19. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2021.41.2007>.
32. Conroy T, Castan F, Lopez A, Turpin A, Ben Abdelghani M, Wei AC, et al. Five-Year Outcomes of FOLFIRINOX vs Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2022 Nov 17;8(11):1571–8.
33. Conroy T, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, et al. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(10):1196–205.
34. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, et al. Nab-paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: Long-term survival from a phase III trial. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Feb 1;107(2):113–20.
35. Cunningham D, Chau I, Stocken DD, Valle JW, Smith D, Steward W, et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Nov 20;27(33):5513–8.
36. Kindler HL, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Overall Survival Results From the POLO Trial: A Phase III Study of Active Maintenance Olaparib Versus Placebo for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer [Internet]. *J Clin Oncol*. 2022. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2021.41.2007>.

37. Sohal DPS, Kennedy EB, Cinar P, Thierry Conroy ;, Mehmet ;, Copur S, et al. Metastatic Pancreatic Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol* [Internet]. 2020;38:3217–30. Available from: <https://doi>.
38. Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, Dean A, Shan YS, Jameson G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): A global, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2016 Feb 6;387(10018):545–57.
39. Oettle H, Riess H, Stieler JM, Heil G, Schwaner I, Seraphin J, et al. Second-line oxaliplatin, folinic acid, and fluorouracil versus folinic acid and fluorouracil alone for gemcitabine-refractory pancreatic cancer: Outcomes from the CONKO-003 Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Aug 10;32(23):2423–9.
40. Pistoni L, Gentiluomo M, Lu Y, de Maturana EL, Hlavac V, Vanella G, et al. Associations between pancreatic expression quantitative traits and risk of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2021 Aug 1;42(8):1037–45.
41. Gentiluomo M, Canzian F, Nicolini A, Gemignani F, Landi S, Campa D. Germline genetic variability in pancreatic cancer risk and prognosis. Vol. 79, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2022. p. 105–31.
42. Ren N, Dai S, Ma S, Yang F. Strategies for activity analysis of single nucleotide polymorphisms associated with human diseases. Vol. 103, *Clinical Genetics*. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 392–400.
43. Yang W, Zhang T, Song X, Dong G, Xu L, Jiang F. SNP-Target Genes Interaction Perturbing the Cancer Risk in the Post-GWAS. Vol. 14, *Cancers*. MDPI; 2022.

44. Zhuo-Miao Y, Li-Juan L, Ming-Bo L, Hong-Yuan Q, Jing-Hui Zheng, Chi Z, et al. A systematic review and network meta-analysis of single nucleotide polymorphisms associated with pancreatic cancer risk. *Aging*. 2020;25256–74.
45. Tang H, Wei P, Duell EJ, Risch HA, Olson SH, Bueno-De-Mesquita HB, et al. Genes-environment interactions in obesity- and diabetes-associated pancreatic cancer: A GWAS data analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2014 Jan;23(1):98–106.
46. Pang Y, Lv J, Wu T, Yu C, Guo Y, Chen Y, et al. Associations of diabetes, circulating protein biomarkers, and risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2024 Feb 24;130(3):504–10.
47. Koyanagi YN, Oze I, Kasugai Y, Kawakatsu Y, Taniyama Y, Hara K, et al. New insights into the genetic contribution of ALDH2 rs671 in pancreatic carcinogenesis: Evaluation by mediation analysis. *Cancer Sci*. 2022 Apr 1;113(4):1441–50.
48. Zhang AMY, Xia YH, Lin JSH, Chu KH, Wang WCK, Ruitter TJJ, et al. Hyperinsulinemia acts via acinar insulin receptors to initiate pancreatic cancer by increasing digestive enzyme production and inflammation. *Cell Metab*. 2023 Dec 5;35(12):2119–2135.e5.
49. Arem H, Yu K, Xiong X, Moy K, Freedman ND, Mayne ST, et al. Vitamin D metabolic pathway genes and pancreatic cancer risk. *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3).
50. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015 Feb 26;518(7540):495–501.
51. Gentiluomo M, Lu Y, Canzian F, Campa D. Genetic variants in taste-related genes and risk of pancreatic cancer. *Mutagenesis*. 2019 Sep 1;34(5–6):391–4.
52. Klein AP, Wolpin BM, Risch HA, Stolzenberg-Solomon RZ, Mocci E, Zhang M, et al. Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).

53. Giaccherini M, Gori L, Gentiluomo M, Farinella R, Cervena K, Skieceviciene J, et al. A scan of all coding region variants of the human genome, identifies 13q12.2-rs9579139 and 15q24.1-rs2277598 as novel risk loci for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2023;44(8–9):642–9.
54. Gentiluomo M, García PP, Galeotti AA, Talar-Wojnarowska R, Tjaden C, Tavano F, et al. Genetic variability of the ABCC2 gene and clinical outcomes in pancreatic cancer patients. *Carcinogenesis*. 2019 Apr 1;40(4):544–50.
55. Petersen GM, Amundadottir L, Fuchs CS, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, Jacobs KB, et al. A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat Genet*. 2010 Mar;42(3):224–8.
56. Wolpin BM, Rizzato C, Kraft P, Kooperberg C, Petersen GM, Wang Z, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2014;46(9):994–1000.
57. Low SK, Kuchiba A, Zembutsu H, Saito A, Takahashi A, Kubo M, et al. Genome-wide association study of pancreatic cancer in Japanese population. *PLoS One*. 2010;5(7).
58. Wu C, Miao X, Huang L, Che X, Jiang G, Yu D, et al. Genome-wide association study identifies five loci associated with susceptibility to pancreatic cancer in Chinese populations. *Nat Genet*. 2012 Jan;44(1):62–6.
59. Campa D, Rizzato C, Bauer AS, Werner J, Capurso G, Costello E, et al. Lack of replication of seven pancreatic cancer susceptibility loci identified in two Asian populations. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2013;22(2):320–3.

60. Ünal P, Lu Y, Bueno-de-Mesquita B, van Eijck CHJ, Talar-Wojnarowska R, Szentesi A, et al. Polymorphisms in transcription factor binding sites and enhancer regions and pancreatic ductal adenocarcinoma risk. *Hum Genomics*. 2024 Dec 1;18(1).
61. Hosoda W, Chianchiano P, Griffin JF, Pittman ME, Brosens LAA, Noë M, et al. Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *Journal of Pathology*. 2017 May 1;242(1):16–23.
62. Kasuga A, Okamoto T, Udagawa S, Mori C, Mie T, Furukawa T, et al. Molecular Features and Clinical Management of Hereditary Pancreatic Cancer Syndromes and Familial Pancreatic Cancer. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
63. Gardiner A, Kidd J, Elias MC, Young K, Mabey B, Taherian N, et al. Pancreatic Ductal Carcinoma Risk Associated With Hereditary Cancer-Risk Genes. *J Natl Cancer Inst*. 2022 Jul 1;114(7):996–1002.
64. Petersen GM. Familial pancreatic cancer. Vol. 43, *Seminars in Oncology*. W.B. Saunders; 2016. p. 548–53.
65. Rebours V, Boutron-Ruault MC, Schnee M, Férec C, Maire F, Hammel P, et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: A national exhaustive series. *American Journal of Gastroenterology*. 2008 Jan;103(1):111–9.
66. Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, et al. Risk of Pancreatic Cancer in Families With Lynch Syndrome [Internet]. Available from: <http://seer.cancer.gov>
67. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, et al. Beyond li fraumeni syndrome: Clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Mar 10;27(8):1250–6.

68. Hsu FC, Roberts NJ, Childs E, Porter N, Rabe KG, Borgida A, et al. Risk of Pancreatic Cancer among Individuals with Pathogenic Variants in the ATM Gene. *JAMA Oncol.* 2021 Nov 1;7(11):1664–8.
69. Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. Vol. 13, *Cell Metabolism*. 2011. p. 495–504.
70. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. Vol. 159, *Cell*. Cell Press; 2014. p. 1263–76.
71. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. Vol. 20, *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 521–7.
72. Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
73. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017 Jul 3;36(13):1811–36.
74. Nascimbeni AC, Codogno P, Morel E. Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. Vol. 284, *FEBS Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 1267–78.
75. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. Vol. 14, *Autophagy*. Taylor and Francis Inc.; 2018. p. 207–15.
76. Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. Vol. 24, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research; 2023. p. 560–75.

77. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. Vol. 19, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2020.
78. Frangež Ž, Gérard D, He Z, Gavriil M, Fernández-Marrero Y, Seyed Jafari SM, et al. ATG5 and ATG7 Expression Levels Are Reduced in Cutaneous Melanoma and Regulated by NRF1. *Front Oncol*. 2021 Aug 12;11.
79. Poole LP, Macleod KF. Mitophagy in tumorigenesis and metastasis. Vol. 78, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 3817–51.
80. Bernardini JP, Lazarou M, Dewson G. Parkin and mitophagy in cancer. Vol. 36, *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2017. p. 1315–27.
81. Cheung EC, DeNicola GM, Nixon C, Blyth K, Labuschagne CF, Tuveson DA, et al. Dynamic ROS Control by TIGAR Regulates the Initiation and Progression of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Feb 10;37(2):168-182.e4.
82. Wei H, Wang C, Croce CM, Guan JL. p62/SQSTM1 synergizes with autophagy for tumor growth in vivo. *Genes Dev*. 2014 Jun 1;28(11):1204–16.
83. Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Takesue S, Nakayama H, Abe T, et al. Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice. *Gastroenterology*. 2017 May 1;152(6):1492-1506.e24.
84. Onorati A V., Dyczynski M, Ojha R, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer. Vol. 124, *Cancer*. John Wiley and Sons Inc.; 2018. p. 3307–18.
85. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. Vol. 17, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2017. p. 528–42.

86. Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, Mackay G, Mrowinska A, et al. P53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*. 2013;504(7479):296–300.
87. Chen HT, Liu H, Mao MJ, Tan Y, Mo XQ, Meng XJ, et al. Crosstalk between autophagy and epithelial-mesenchymal transition and its application in cancer therapy. Vol. 18, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2019.
88. Liang C, Xu J, Meng Q, Zhang B, Liu J, Hua J, et al. TGF β 1-induced autophagy affects the pattern of pancreatic cancer progression in distinct ways depending on SMAD4 status. *Autophagy*. 2020 Mar 3;16(3):486–500.
89. Wang Y, Xiong H, Liu D, Hill C, Ertay A, Li J, et al. Autophagy inhibition specifically promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion in RAS-mutated cancer cells. *Autophagy*. 2019 May 4;15(5):886–99.
90. Yamamoto K, Venida A, Yano J, Biancur DE, Kakiuchi M, Gupta S, et al. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature*. 2020 May 7;581(7806):100–5.
91. Galluzzi L, Pedro JMBS, Demaria S, Formenti SC, Kroemer G. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy. Vol. 14, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 247–58.
92. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Levine B, Green DR, Kroemer G. Pharmacological modulation of autophagy: Therapeutic potential and persisting obstacles. Vol. 16, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2017. p. 487–511.

93. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*. 2007 Feb 1;117(2):326–36.
94. Wolpin BM, Rubinson DA, Wang X, Chan JA, Cleary JM, Enzinger PC, et al. Phase II and Pharmacodynamic Study of Autophagy Inhibition Using Hydroxychloroquine in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Oncologist*. 2014 Jun 1;19(6):637–8.
95. Samaras P, Tusup M, Nguyen-Kim TDL, Seifert B, Bachmann H, von Moos R, et al. Phase I study of a chloroquine–gemcitabine combination in patients with metastatic or unresectable pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017 Nov 1;80(5):1005–12.
96. Karasic TB, O’Hara MH, Loaiza-Bonilla A, Reiss KA, Teitelbaum UR, Borazanci E, et al. Effect of Gemcitabine and nab-Paclitaxel with or Without Hydroxychloroquine on Patients with Advanced Pancreatic Cancer: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2019 Jul 1;5(7):993–8.
97. Boone BA, Bahary N, Zureikat AH, Moser AJ, Normolle DP, Wu WC, et al. Safety and Biologic Response of Pre-operative Autophagy Inhibition in Combination with Gemcitabine in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec 1;22(13):4402–10.
98. Zeh HJ, Bahary N, Boone BA, Singhi AD, Miller-Ocuin JL, Normolle DP, et al. A randomized phase II preoperative study of autophagy inhibition with high-dose hydroxychloroquine and gemcitabine/nab-paclitaxel in pancreatic cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2020 Jul 1;26(13):3126–34.

99. Tang H, Ge Y, You T, Li X, Wang Y, Cheng Y, et al. A real-world analysis of trametinib in combination with hydroxychloroquine or CDK4/6 inhibitor as third- or later-line therapy in metastatic pancreatic adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2023 Dec 1;23(1):958.
100. Childs EJ, Mocci E, Campa D, Bracci PM, Gallinger S, Goggins M, et al. Common variation at 2p13.3, 3q29, 7p13 and 17q25.1 associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet*. 2015 Aug 30;47(8):911–6.
101. Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet*. 2009 Jun;5(6).
102. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2006 Aug;38(8):904–9.
103. Willer CJ, Li Y, Abecasis GR. METAL: Fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics*. 2010 Jul 8;26(17):2190–1.
104. Li Y, Oosting M, Smeekens SP, Jaeger M, Aguirre-Gamboa R, Le KTT, et al. A Functional Genomics Approach to Understand Variation in Cytokine Production in Humans. *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):1099-1110.e14.
105. Yeretssian G, Correa RG, Doiron K, Fitzgerald P, Dillon CP, Green DR, et al. Non-apoptotic role of BID in inflammation and innate immunity. *Nature*. 2011 Jun 2;474(7349):96–9.
106. Lamparska-Przybysz M, Gajkowska B, Motyl T. BID-deficient breast cancer MCF-7 cells as a model for the study of autophagy in cancer therapy. *Autophagy*. 2006;2(1):47–8.
107. Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. 1998.

108. Shelton SN, Shawgo ME, Robertson JD. Cleavage of Bid by executioner caspases mediates feed forward amplification of mitochondrial outer membrane permeabilization during genotoxic stress-induced apoptosis in Jurkat cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Apr 24;284(17):11247–55.
109. Bertran-Alamillo J, Giménez-Capitán A, Román R, Talbot S, Whiteley R, Floc'h N, et al. BID expression determines the apoptotic fate of cancer cells after abrogation of the spindle assembly checkpoint by AURKB or TTK inhibitors. *Mol Cancer*. 2023 Dec 1;22(1).
110. Takeda T, Wakasa K ichi, Tsujimoto M, Sakon M, Matsuura N. Expression of p73 and p63 proteins in pancreatic adenocarcinoma: p73 overexpression is inversely correlated with biological aggressiveness. Vol. 8, *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*. 2001.
111. Danilov A V., Neupane D, Nagaraja AS, Feofanova E V., Humphries LA, DiRenzo J, et al. DeltaNp63alpha-mediated induction of Epidermal growth factor receptor promotes pancreatic cancer cell growth and chemoresistance. *PLoS One*. 2011;6(10).
112. Rouschop KMA, Van Den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *Journal of Clinical Investigation*. 2010 Jan 4;120(1):127–41.
113. Zhang X, Lao M, Yang H, Sun K, Dong Y, He L, et al. Targeting cancer-associated fibroblast autophagy renders pancreatic cancer eradicable with immunotherapy by inhibiting adaptive immune resistance. *Autophagy*. 2024;20(6):1314–34.
114. Ortega MA, Pekarek L, Fraile-Martinez O, Garcia-Montero C, Saez MA, Asúnsolo A, et al. Implication of ERBB2 as a Predictive Tool for Survival in Patients with Pancreatic Cancer in Histological Studies. *Current Oncology*. 2022 Apr 1;29(4):2442–53.

115. Brodie A, Azaria JR, Ofran Y. How far from the SNP may the causative genes be? *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 27;44(13):6046–54.

10. ANEXOS

10.1 Tabla suplementaria 1

Tabla suplementaria 1. Lista de genes asociados con la autofagia seleccionados,

GeneId	Name	Symbol
55626	autophagy/beclin-1 regulator 1	<i>AMBRA1</i>
8542	apolipoprotein L, 1	<i>APOL1</i>
405	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	<i>ARNT</i>
410	arylsulfatase A	<i>ARSA</i>
411	arylsulfatase B	<i>ARSB</i>
468	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	<i>ATF4</i>
22926	activating transcription factor 6	<i>ATF6</i>
83734	ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG10</i>
9140	ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG12</i>
55054	ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)	<i>ATG16L1</i>
89849	ATG16 autophagy related 16-like 2 (S. cerevisiae)	<i>ATG16L2</i>
23130	ATG2 autophagy related 2 homolog A (S. cerevisiae)	<i>ATG2A</i>
55102	ATG2 autophagy related 2 homolog B (S. cerevisiae)	<i>ATG2B</i>
64422	ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG3</i>
115201	ATG4 autophagy related 4 homolog A (S. cerevisiae)	<i>ATG4A</i>
23192	ATG4 autophagy related 4 homolog B (S. cerevisiae)	<i>ATG4B</i>
84938	ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)	<i>ATG4C</i>
84971	ATG4 autophagy related 4 homolog D (S. cerevisiae)	<i>ATG4D</i>
9474	ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG5</i>
10533	ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae)	<i>ATG7</i>
79065	ATG9 autophagy related 9 homolog A (S. cerevisiae)	<i>ATG9A</i>
285973	ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae)	<i>ATG9B</i>
471	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	<i>ATIC</i>
573	BCL2-associated athanogene	<i>BAG1</i>
9531	BCL2-associated athanogene 3	<i>BAG3</i>
578	BCL2-antagonist/killer 1	<i>BAK1</i>
581	BCL2-associated X protein	<i>BAX</i>
596	B-cell CLL/lymphoma 2	<i>BCL2</i>
598	BCL2-like 1	<i>BCL2L1</i>
8678	beclin 1, autophagy related	<i>BECN1</i>
637	BH3 interacting domain death agonist	<i>BID</i>
332	baculoviral IAP repeat-containing 5	<i>BIRC5</i>
57448	baculoviral IAP repeat-containing 6	<i>BIRC6</i>
662	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	<i>BNIP1</i>
664	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	<i>BNIP3</i>
665	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	<i>BNIP3L</i>
60673	chromosome 12 open reading frame 44	<i>C12orf44</i>
23591	chromosome 17 open reading frame 88	<i>C17orf88</i>
10241	calcium binding and coiled-coil domain 2	<i>CALCOCO2</i>
10645	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	<i>CAMKK2</i>
821	calnexin	<i>CANX</i>

823	calpain 1, (mu/I) large subunit	<i>CAPN1</i>
11132	calpain 10	<i>CAPN10</i>
824	calpain 2, (m/II) large subunit	<i>CAPN2</i>
826	calpain, small subunit 1	<i>CAPNS1</i>
834	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	<i>CASP1</i>
836	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>CASP3</i>
837	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>CASP4</i>
841	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>CASP8</i>
6347	chemokine (C-C motif) ligand 2	<i>CCL2</i>
729230	chemokine (C-C motif) receptor 2	<i>CCR2</i>
4179	CD46 molecule, complement regulatory protein	<i>CD46</i>
1026	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	<i>CDKN1A</i>
1027	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	<i>CDKN1B</i>
1029	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	<i>CDKN2A</i>
8837	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	<i>CFLAR</i>
25978	chromatin modifying protein 2B	<i>CHMP2B</i>
128866	chromatin modifying protein 4B	<i>CHMP4B</i>
1201	ceroid-lipofuscinosis. neuronal 3	<i>CLN3</i>
1508	cathepsin B	<i>CTSB</i>
1509	cathepsin D	<i>CTSD</i>
1514	cathepsin L1	<i>CTSL1</i>
6376	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	<i>CX3CL1</i>
7852	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	<i>CXCR4</i>
1612	death-associated protein kinase 1	<i>DAPK1</i>
23604	death-associated protein kinase 2	<i>DAPK2</i>
1649	DNA-damage-inducible transcript 3	<i>DDIT3</i>
9077	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	<i>DIRAS3</i>
10395	deleted in liver cancer 1	<i>DLC1</i>
3337	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	<i>DNAJB1</i>
4189	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	<i>DNAJB9</i>
55332	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	<i>DRAM1</i>
9695	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	<i>EDEM1</i>
1938	eukaryotic translation elongation factor 2	<i>EEF2</i>
29904	eukaryotic elongation factor-2 kinase	<i>EEF2K</i>
1956	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	<i>EGFR</i>
5610	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	<i>EIF2AK2</i>
9451	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	<i>EIF2AK3</i>
1965	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	<i>EIF2S1</i>
1978	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	<i>EIF4EBP1</i>
1981	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1	<i>EIF4G1</i>
2064	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	<i>ERBB2</i>
2081	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	<i>ERN1</i>
30001	ERO1-like (S. cerevisiae)	<i>ERO1L</i>
8772	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	<i>FADD</i>
55578	family with sequence similarity 48, member A	<i>FAM48A</i>
355	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	<i>FAS</i>
2280	FK506 binding protein 1A, 12kDa	<i>FKBP1A</i>

2281	FK506 binding protein 1B, 12,6 kDa	<i>FKBP1B</i>
2353	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	<i>FOS</i>
2308	forkhead box O1	<i>FOXO1</i>
2309	forkhead box O3	<i>FOXO3</i>
2548	glucosidase, alpha; acid	<i>GAA</i>
11337	GABA(A) receptor-associated protein	<i>GABARAP</i>
23710	GABA(A) receptor-associated protein like 1	<i>GABARAPL1</i>
11345	GABA(A) receptor-associated protein-like 2	<i>GABARAPL2</i>
2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>
2773	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	<i>GNAI3</i>
10399	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	<i>GNB2L1</i>
57120	golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing	<i>GOPC</i>
2894	glutamate receptor, ionotropic, delta 1	<i>GRID1</i>
2895	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	<i>GRID2</i>
3065	histone deacetylase 1	<i>HDAC1</i>
10013	histone deacetylase 6	<i>HDAC6</i>
9146	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	<i>HGS</i>
3091	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	<i>HIF1A</i>
3326	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	<i>HSP90AB1</i>
3309	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	<i>HSPA5</i>
3312	heat shock 70kDa protein 8	<i>HSPA8</i>
26353	heat shock 22kDa protein 8	<i>HSPB8</i>
3458	interferon, gamma	<i>IFNG</i>
3551	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells. kinase beta	<i>IKBKB</i>
9641	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells. kinase epsilon	<i>IKBKE</i>
11009	interleukin 24	<i>IL24</i>
345611	immunity-related GTPase family, M	<i>IRGM</i>
3675	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	<i>ITGA3</i>
3655	integrin, alpha 6	<i>ITGA6</i>
3688	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	<i>ITGB1</i>
3691	integrin, beta 4	<i>ITGB4</i>
3708	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	<i>ITPR1</i>
2548	glucosidase, alpha; acid	<i>GAA</i>
11337	GABA(A) receptor-associated protein	<i>GABARAP</i>
23710	GABA(A) receptor-associated protein like 1	<i>GABARAPL1</i>
11345	GABA(A) receptor-associated protein-like 2	<i>GABARAPL2</i>
2597	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>
2773	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	<i>GNAI3</i>
10399	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	<i>GNB2L1</i>
57120	golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing	<i>GOPC</i>
2894	glutamate receptor, ionotropic, delta 1	<i>GRID1</i>
2895	glutamate receptor, ionotropic, delta 2	<i>GRID2</i>
9711	KIAA0226	<i>KIAA0226</i>
9776	KIAA0652	<i>KIAA0652</i>
22863	KIAA0831	<i>KIAA0831</i>

3799	kinesin family member 5B	<i>KIF5B</i>
54800	kelch-like 24 (Drosophila)	<i>KLHL24</i>
3916	lysosomal-associated membrane protein 1	<i>LAMP1</i>
3920	lysosomal-associated membrane protein 2	<i>LAMP2</i>
84557	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha	<i>MAP1LC3A</i>
81631	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	<i>MAP1LC3B</i>
440738	microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma	<i>MAP1LC3C</i>
5609	mitogen-activated protein kinase kinase 7	<i>MAP2K7</i>
5594	mitogen-activated protein kinase 1	<i>MAPK1</i>
5595	mitogen-activated protein kinase 3	<i>MAPK3</i>
5599	mitogen-activated protein kinase 8	<i>MAPK8</i>
9479	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	<i>MAPK8IP1</i>
5601	mitogen-activated protein kinase 9	<i>MAPK9</i>
51360	membrane-bound transcription factor peptidase, site 2	<i>MBTPS2</i>
64223	MTOR associated protein, LST8 homolog (S. cerevisiae)	<i>MLST8</i>
64419	myotubularin related protein 14	<i>MTMR14</i>
2475	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	<i>MTOR</i>
4609	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	<i>MYC</i>
92345	nuclear assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae)	<i>NAF1</i>
10135	nicotinamide phosphoribosyltransferase	<i>NAMPT</i>
4077	neighbor of BRCA1 gene 1	<i>NBR1</i>
10787	NCK-associated protein 1	<i>NCKAP1</i>
4780	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	<i>NFE2L2</i>
4790	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	<i>NFKB1</i>
159296	NK2 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)	<i>NKX2-3</i>
58484	NLR family, CARD domain containing 4	<i>NLRC4</i>
4864	Niemann-Pick disease, type C1	<i>NPC1</i>
3084	neuregulin 1	<i>NRG1</i>
9542	neuregulin 2	<i>NRG2</i>
10718	neuregulin 3	<i>NRG3</i>
5034	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	<i>P4HB</i>
5071	Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2, parkin	<i>PARK2</i>
142	poly (ADP-ribose) polymerase 1	<i>PARP1</i>
8682	phosphoprotein enriched in astrocytes 15	<i>PEA15</i>
27043	proline, glutamate and leucine rich protein 1	<i>PELP1</i>
5195	peroxisomal biogenesis factor 14	<i>PEX14</i>
8504	peroxisomal biogenesis factor 3	<i>PEX3</i>
5289	phosphoinositide-3-kinase, class 3	<i>PIK3C3</i>
30849	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4	<i>PIK3R4</i>
65018	PTEN induced putative kinase 1	<i>PINK1</i>
23645	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	<i>PPP1R15A</i>
5564	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit	<i>PRKAB1</i>
5573	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)	<i>PRKARIA</i>
5580	protein kinase C, delta	<i>PRKCD</i>
5588	protein kinase C, theta	<i>PRKCQ</i>
5728	phosphatase and tensin homolog	<i>PTEN</i>
5753	PTK6 protein tyrosine kinase 6	<i>PTK6</i>
8766	RAB11A, member RAS oncogene family	<i>RAB11A</i>

5861	RAB1A, member RAS oncogene family	<i>RAB1A</i>
53917	RAB24, member RAS oncogene family	<i>RAB24</i>
83452	RAB33B, member RAS oncogene family	<i>RAB33B</i>
5868	RAB5A, member RAS oncogene family	<i>RAB5A</i>
7879	RAB7A, member RAS oncogene family	<i>RAB7A</i>
5879	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	<i>RAC1</i>
5894	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	<i>RAF1</i>
5925	retinoblastoma 1	<i>RB1</i>
9821	RB1-inducible coiled-coil 1	<i>RB1CC1</i>
5970	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	<i>RELA</i>
10287	regulator of G-protein signaling 19	<i>RGS19</i>
6009	Ras homolog enriched in brain	<i>RHEB</i>
6198	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1	<i>RPS6KB1</i>
57521	regulatory associated protein of MTOR, complex 1	<i>RPTOR</i>
56681	SAR1 homolog A (S. cerevisiae)	<i>SAR1A</i>
5265	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1	<i>SERPINA1</i>
83667	sestrin 2	<i>SESN2</i>
51100	SH3-domain GRB2-like endophilin B1	<i>SH3GLB1</i>
23411	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	<i>SIRT1</i>
22933	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (S. cerevisiae)	<i>SIRT2</i>
8877	sphingosine kinase 1	<i>SPHK1</i>
83985	spinster homolog 1 (Drosophila)	<i>SPNS1</i>
8878	sequestosome 1	<i>SQSTM1</i>
6767	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)	<i>ST13</i>
6794	serine/threonine kinase 11	<i>STK11</i>
29110	TANK-binding kinase 1	<i>TBK1</i>
<i>Not included</i>	transcription factor EB	<i>TFEB</i>
10548	transmembrane 9 superfamily member 1	<i>TM9SF1</i>
81671	transmembrane protein 49	<i>TMEM49</i>
157753	transmembrane protein 74	<i>TMEM74</i>
8743	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	<i>TNFSF10</i>
7157	tumor protein p53	<i>TP53</i>
58476	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	<i>TP53INP2</i>
8626	tumor protein p63	<i>TP63</i>
7161	tumor protein p73	<i>TP73</i>
7248	tuberous sclerosis 1	<i>TSC1</i>
7249	tuberous sclerosis 2	<i>TSC2</i>
286319	tumor suppressor candidate 1	<i>TUSC1</i>
8408	unc-51-like kinase 1 (C, elegans)	<i>ULK1</i>
9706	unc-51-like kinase 2 (C, elegans)	<i>ULK2</i>
25989	unc-51-like kinase 3 (C, elegans)	<i>ULK3</i>
	unc-51 like kinase 4	<i>ULK4</i>
9100	ubiquitin specific peptidase 10	<i>USP10</i>
7405	UV radiation resistance associated gene	<i>UVRAG</i>
9341	vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)	<i>VAMP3</i>

6845	vesicle-associated membrane protein 7	<i>VAMP7</i>
7422	vascular endothelial growth factor A	<i>VEGFA</i>
23001	WD repeat and FYVE domain containing 3	<i>WDFY3</i>
11152	WD repeat domain 45	<i>WDR45</i>
56270	WDR45-like	<i>WDR45L</i>
55062	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	<i>WIPI1</i>
26100	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	<i>WIPI2</i>
53349	zinc finger, FYVE domain containing 1	<i>ZFYVE1</i>

10.2. Tabla suplementaria 2

Tabla suplementaria 2. Tipos de células analizadas en sangre total o en células sanguíneas mononucleares periféricas.

<i>Name</i>	Parent	Grandparent
<i>Leukocytes_CD45P_LMI1</i>	None	None
<i>Neutrophils_LMI1</i>	1	None
<i>Monocytes_CD14P_LMI1</i>	1	None
<i>Classical_monocytes_CD14PPCD16N_LMI1</i>	3	1
<i>Intermediate_monocytes_CD14PPCD16P_LMI1</i>	3	1
<i>NonClassical_monocytes_CD14PCD16P_LMI1</i>	3	1
<i>Lymphocytes_LMI1</i>	1	None
<i>T_cells_CD3P_CD56N_LMI1</i>	7	1
<i>NK_cells_CD3N_CD56P_LMI1</i>	7	1
<i>NKT_cells_CD3P_CD56P_LMI1</i>	7	1
<i>B_cells_CD19P_LMI1</i>	7	1
<i>CD4P_T_cells_LMI1</i>	8	7
<i>CD8P_T_cells_LMI1</i>	8	7
<i>DP_CD4P_CD8P_LMI1</i>	8	7
<i>DN_CD4N_CD8N_LMI1</i>	8	7
<i>CD4P_CD25high_Treg_LMI1</i>	12	8
<i>NK_dim_CD56P_CD16P_LMI1</i>	9	7
<i>NK_bright_CD56PP_CD16N_LMI1</i>	9	7
<i>NK_CD56P_CD16N_LMI1</i>	9	7
<i>Leukocytes_CD45P_LMI2</i>	justRef	justRef
<i>T_cells_CD3P_CD56N_LMI2</i>	justRef	justRef
<i>CD4P_T_cells_LMI2</i>	justRef	justRef
<i>CD8P_T_cells_LMI2</i>	justRef	justRef
<i>CD45RON_CD45RAP_T_cells_LMI2</i>	21	20
<i>CD45ROP_CD45RAP_T_cells_LMI2</i>	21	20
<i>CD45ROP_CD45RAN_T_cells_LMI2</i>	21	20
<i>CD45RON_CD45RAN_T_cells_LMI2</i>	21	20
<i>CD4P_CD25P_CD127low_Treg_LMI2</i>	22	21
<i>CD4P_Naive_CD45RAP_CD27P_LMI2</i>	22	21
<i>CD4P_Eff_CD45RAP_CD27N_LMI2</i>	22	21
<i>CD4P_EM_CD45RAN_CD27N_LMI2</i>	22	21
<i>CD4P_CM_CD45RAN_CD27P_LMI2</i>	22	21
<i>CD4P_Naive_CD45RON_CD27P_LMI2</i>	22	21
<i>CD4P_Eff_CD45RON_CD27N_LMI2</i>	22	21
<i>CD4P_EM_CD45ROP_CD27N_LMI2</i>	22	21
<i>CD4P_CM_CD45ROP_CD27P_LMI2</i>	22	21
<i>CD8P_Naive_CD45RAP_CD27P_LMI2</i>	23	21
<i>CD8P_Eff_CD45RAP_CD27N_LMI2</i>	23	21

<i>CD8P_EM_CD45RAN_CD27N_LMI2</i>	23	21
<i>CD8P_CM_CD45RAN_CD27P_LMI2</i>	23	21
<i>CD8P_Naive_CD45RON_CD27P_LMI2</i>	23	21
<i>CD8P_Eff_CD45RON_CD27N_LMI2</i>	23	21
<i>CD8P_EM_CD45ROP_CD27N_LMI2</i>	23	21
<i>CD8P_CM_CD45ROP_CD27P_LMI2</i>	23	21
<i>Lymphocytes_LMI3</i>	justRef	justRef
<i>B_cells_CD3N_CD19P_LMI3</i>	justRef	justRef
<i>CD27N_IgMP_LMI3</i>	justRef	justRef
<i>CD19P_CD20N_Plasma_blasts_LMI3</i>	47	46
<i>CD19P_CD20P_B_cells_LMI3</i>	47	46
<i>IgDN_CD5PP_LMI3</i>	47	46
<i>IgDP_CD5PP_LMI3</i>	47	46
<i>IgDN_CD5P_LMI3</i>	47	46
<i>IgDP_CD5P_LMI3</i>	47	46
<i>CD24P_CD38P_LMI3</i>	47	46
<i>Transitional_B_cells_CD24PP_CD38PP_LMI3</i>	47	46
<i>IgDN_IgMP_LMI3</i>	47	46
<i>IgDP_IgMP_LMI3</i>	47	46
<i>IgDP_IgMN_LMI3</i>	47	46
<i>IgDN_IgMN_LMI3</i>	47	46
<i>Transitional_B_cell_CD27N_IgMP_CD24P_CD38high_LMI3</i>	48	47
<i>Mature_naive_CD24P_CD38P_LMI3</i>	48	47
<i>IgMN_LMI3</i>	55	47
<i>CD24P_CD38P_CD27P_IgMP_LMI3</i>	55	47
<i>Natural_effector_CD24P_CD38P_IgDP_IgMP_LMI3</i>	55	47
<i>Plasmablast_IgDN_IgMN_CD38PP_LMI3</i>	60	47
<i>Class_switched_memory_IgDN_IgMN_CD38P_CD27P_LMI3</i>	60	47
<i>IgDN_IgMN_CD27N_LMI3</i>	60	47
<i>Naive_B_cells_IgDP_IgMP_CD27N_LMI3</i>	58	47
<i>Memory_B_cells_IgDP_IgMP_CD27P_LMI3</i>	58	47
<i>IgDN_IgMP_CD27N_LMI3</i>	57	47
<i>IgM_only_memory_IgDN_IgMP_CD27_LMI3</i>	57	47
<i>IgMP_CD38PP_CD27P_LMI3</i>	57+58	47
<i>Class_non_switched_memory_IgMP_CD38P_CD27P_LMI3</i>	57+58	47
<i>IgMP_CD27N_LMI3</i>	57+58	47
<i>Lymphocytes_PBMC_LMI4</i>	justRef	justRef
<i>CD4P_T_cells_PBMC_LMI4</i>	justRef	justRef
<i>DP_CD4P_CD8P_PBMC_LMI4</i>	justRef	justRef
<i>DN_CD4N_CD8N_PBMC_LMI4</i>	justRef	justRef
<i>CD8P_T_cells_PBMC_LMI4</i>	justRef	justRef
<i>CD25N_CD127P_Tconv_PBMC_LMI4</i>	justRef	justRef
<i>CD4P_CD25P_CD127low_Treg_PBMC_LMI4</i>	justRef	justRef
<i>Prol_DN_CD4NCD8N_PBMC_LMI4</i>	80	77
<i>Prol_DP_CD4PCD8P_PBMC_LMI4</i>	79	77
<i>Prol_CD4P_Tconv_PBMC_LMI4</i>	82	78

<i>Prol_CD4P_Treg_PBMC_LMI4</i>	83	78
<i>Prol_CD8_PBMC_LMI4</i>	81	77
<i>Treg_FOXP3P_HeliosP_PBMC_LMI4</i>	83	78
<i>Treg_FOXP3P_HeliosN_PBMC_LMI4</i>	83	78
<i>Treg_CD45RAP_PBMC_LMI4</i>	83	78
<i>Treg_CD45RAN_PBMC_LMI4</i>	83	78
<i>Treg_HLANDRP_PBMC_LMI4</i>	83	78

Las células incluidas en LMI1-3 se midieron en sangre completa y las incluidas en LIM4 en PBMCs.

10.3. Tabla suplementaria 3

Tabla suplementaria 3. Metabolitos séricos y plasmáticos medidos en la cohorte HFGP.

<i>Panel</i>	Marcadores	Localización
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	4E-BP1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	ADA	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	ARTN	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	AXIN1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	Beta-NGF	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CASP-8	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL11	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL19	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL20	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL23	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL25	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL28	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL3	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CCL4	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD244	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD40	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD5	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD6	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CD8A	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CDCP1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CSF-1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CST5	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CX3CL1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CXCL1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CXCL10	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CXCL11	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CXCL5	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CXCL6	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	CXCL9	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	DNER	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	EN-RAGE	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	FGF-19	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	FGF-21	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	FGF-23	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	FGF-5	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	Flt3L	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	GDNF	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	HGF	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IFN-gamma	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-1 alpha	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL10	Suero

<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-10RA	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-10RB	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-12B	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL13	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-15RA	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-17A	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-17C	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL18	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-18R1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL2	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-20	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-20RA	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-22 RA1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-24	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-2RB	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL33	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL4	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL5	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL6	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL7	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL8	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	LAP TGF-beta-1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	LIF	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	LIF-R	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	MCP-1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	MCP-2	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	MCP-3	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	MCP-4	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	MMP-1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	MMP-10	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	NRTN	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	NT-3	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	OPG	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	OSM	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	PD-L1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	SCF	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	SIRT2	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	SLAMF1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	ST1A1	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	STAMBP	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TGF-alpha	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TNF	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TNFB	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TNFRSF9	Suero

<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TNFSF14	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TRAIL	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TRANCE	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TSLP	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	TWEAK	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	uPA	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	VEGFA	Suero
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	Assay	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	hsCRP	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL18bpx	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	Resistin	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	Leptin	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	Adiponectin	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	AAT	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-1Ra_Q (Quantikine)	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL18 pg/mL	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-1b pg/mL	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	IL-6 pg/mL	Plasma
<i>Olink INFLAMMATION(v,3021)</i>	VEGF-A	Plasma

10.4. Publicaciones indexadas incluidas en la tesis doctoral

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

PubMed®

Sainz, Juan

Advanced Search

User Guide

Search results

Save Email Send to Display options

Meta-Analysis > Int J Cancer. 2025 Jan 15;156(2):339-352. doi: 10.1002/ijc.35196.
Epub 2024 Sep 25.

Polymorphisms within autophagy-related genes as susceptibility biomarkers for pancreatic cancer: A meta-analysis of three large European cohorts and functional characterization

Fernando Gálvez-Montosa¹, Giulia Peduzzi², José Manuel Sanchez-Maldonado^{3 4 5 6}, Rob Ter Horst^{7 8}, Antonio J Cabrera-Serrano^{4 5}, Manuel Gentiluomo², Angelica Macaudo⁶, Natalia Luque¹, Pelin Ünal⁶, Francisco José García-Verdejo¹, Yang Li^{7 8}, José Antonio López López¹, Angelika Stein⁶, H Bas Bueno-de-Mesquita^{# 9}, Paolo Giorgio Arcidiacono¹⁰, Dalila Luciola Zanette¹¹, Christoph Kahlert¹², Francesco Perri¹³, Pavel Soucek¹⁴, Renata Talar-Wojnarowska¹⁵, George E Theodoropoulos¹⁶, Jakob R Izbicki¹⁷, Hussein Tamás^{18 19}, Hanneke Van Laarhoven^{20 21}, Gennaro Nappo^{22 23}, Maria Chiara Petrone¹⁰, Martin Lovecek²⁴, Roel C H Vermeulen²⁵, Kestutis Adamonis²⁶, Fernando Jesus Reyes-Zurita³, Bernd Hollecsek^{27 28}, Jolanta Sumskiene²⁶, Beatrice Mohelníková-Duchoňová²⁹, Rita T Lawlor^{30 31}, Raffaele Pezzilli³², Mateus Nobrega Aoki¹¹, Claudio Pasquali³³, Vitalija Petrenkiene²⁶, Daniela Basso³⁴, Stefania Bunduc^{18 19 35 36}, Annalisa Comandatore³⁷, Hermann Brenner^{28 38}, Stefano Ermini², Giuseppe Vanella^{39 40}, Mara R Goetz¹⁷, Livia Archibugi^{39 40}, Maurizio Lucchesi⁴¹, Faik Guntac Uzunoglu¹⁷, Olivier Busch^{21 42}, Anna Caterina Milanetto³³, Marta Puzzone⁴³, Juozas Kupcinskas²⁶, Luca Morelli³⁷, Cosimo Sperti³³, Silvia Carrara⁴⁴, Gabriele Capurso^{39 40}, Casper H J van Eijck⁴⁵, Martin Oliverius⁴⁶, Susanne Roth¹², Francesca Tavano¹³, Rudolf Kaaks⁴⁷, Andrea Szentesi⁴⁸, Ludmila Vodickova^{49 50 51}, Claudio Luchini^{30 52}, Ben Schöttker²⁸, Stefano Landi², Orsolya Dohan¹⁹, Matteo Tacelli¹⁰, William Greenhalf⁵³, Maria Gazouli⁵⁴, John P Neoptolemos¹², Giulia Martina Cavestro⁴³, Ugo Boggi⁵⁵, Anna Latiano¹³, Péter Hegyi^{18 19 48 56}, Laura Ginocchi⁴¹, Mihai G Netea^{57 58}, Pedro Sánchez-Rovira¹, Federico Canzian⁶, Daniele Campa², Juan Sainz^{3 4 5 59}

Affiliations + expand

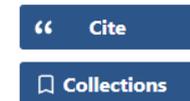
PMID: 39319538 PMID: PMC11578083 DOI: 10.1002/ijc.35196

+ Paperpile

FULL TEXT LINKS



ACTIONS



SHARE



PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Conflict of interest statement

Figures

Similar articles

References

Publication types

MeSH terms

Enlace a la publicación:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39319538/>

