

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA
FACULTAD DE MEDICINA



PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS: NUEVOS
BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y DE RESPUESTA AL
TRATAMIENTO BASADOS EN PERFILES DE EXPRESIÓN
GÉNICA**

Memoria presentada por Dña. Cristina Jiménez Luna
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada

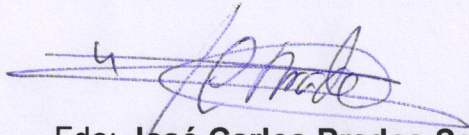
Granada, 09 de enero de 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Cristina Jiménez Luna
ISBN: 978-84-9163-145-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/45406>

La doctoranda, **Cristina Jiménez Luna**, y los directores de la tesis, **José Carlos Prados Salazar**, **Consolación Melguizo Alonso** y **Octavio Caba Pérez**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

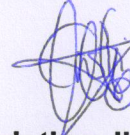
GRANADA A 09/01/2017

Director/es de la Tesis

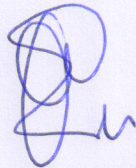


Fdo: **José Carlos Prados Salazar**

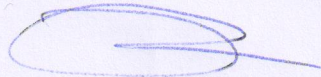
Doctorando



Fdo: **Cristina Jiménez Luna**



Fdo: **Consolación Melguizo Alonso**



Fdo: **Octavio Caba Pérez**

Dr. JOSÉ CARLOS PRADOS SALAZAR,
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que Dña. Cristina Jiménez Luna ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS: NUEVOS BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO BASADOS EN PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 09 de enero de 2017.

Fdo: Dr. D. José Carlos Prados Salazar

Catedrático de Universidad

Dra. CONSOLACIÓN MELGUIZO ALONSO,
CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que Dña. Cristina Jiménez Luna ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS: NUEVOS BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO BASADOS EN PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 09 de enero de 2017.

Fdo: Dra. Dña. Consolación Melguizo Alonso

Catedrática de Universidad

Dr. OCTAVIO CABA PÉREZ,
PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

HACE CONSTAR:

Que Dña. Cristina Jiménez Luna ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS: NUEVOS BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO BASADOS EN PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 09 de enero de 2017.

Fdo: Dr. D. Octavio Caba Pérez

Prof. Contratado Doctor

El 90% del éxito se basa simplemente en insistir.

(Woody Allen)

Índice

	<i>Pág.</i>
I. ABREVIATURAS.....	3
II. RESUMEN.....	7
III. SUMMARY.....	13
IV. INTRODUCCIÓN.....	19
1. PÁNCREAS: NOCIONES ANATÓMICAS Y FISIOLÓCIAS.....	19
2. NEOPLASIAS DEL PÁNCREAS.....	21
3. ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS.....	24
3.1. Epidemiología.....	24
3.2. Factores de riesgo.....	25
3.3. Pronóstico.....	29
3.4. Sintomatología y diagnóstico: marcadores tumorales.....	30
3.4.1. Técnicas de imagen.....	30
3.4.2. Análisis de sangre y biomarcadores tumorales.....	33
3.5. Estadios tumorales.....	35
3.6. Tratamientos.....	36
3.6.1. Tratamiento quirúrgico.....	36
3.6.2. Tratamiento quimioterápico.....	37
3.6.3. Tratamiento radioterápico.....	41
3.6.4. Quimiorradioterapia.....	42
3.6.5. Tratamientos paliativos y de soporte.....	43
3.7. Lesiones precursoras.....	44
3.7.1. Lesiones precursoras quísticas microscópicas.....	45
3.7.2. Lesiones precursoras quísticas macroscópicas.....	46
3.7.2.1. <i>Neoplasia mucinosa papilar intraductal.....</i>	<i>46</i>
3.7.2.2. <i>Neoplasia quística mucinosa.....</i>	<i>47</i>

3.7.3. Alteraciones genéticas en lesiones precursoras.....	47
4. NUEVOS BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS EN CÁNCER: PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	53
4.1. Microarrays de expresión génica.....	53
4.1.1. Validación de los resultados obtenidos mediante microarrays.....	55
4.1.1.1. PCR cuantitativa a tiempo real.....	56
4.2. Biomarcadores en cáncer.....	58
4.2.1. Biomarcadores diagnósticos en adenocarcinoma ductal pancreático.....	60
4.2.2. Fuentes de biomarcadores en adenocarcinoma ductal pancreático.....	61
V. OBJETIVOS.....	67
VI. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.....	71
PUBLICACIÓN 1.....	75
PUBLICACIÓN 2.....	103
PUBLICACIÓN 3.....	141
PUBLICACIÓN 4.....	157
VII. DISCUSIÓN.....	183
1. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PBMCs COMO MARCADOR DE LA PRESENCIA DE PDAC.....	183
2. PANELES DE BIOMARCADORES EN PDAC: ESTUDIO DE DIFERENTES PLATAFORMAS DE MICROARRAYS.....	190
2.1. Metaanálisis: “genes ganados” sobreexpresados en PDAC.....	195
2.2. Metaanálisis: “genes ganados” con disminución de la expresión en PDAC.....	200
3. BIOMARCADORES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ERLOTINIB.....	204
VIII. CONCLUSIONES.....	213
IX. CONCLUSIONS.....	217
X. BIBLIOGRAFÍA.....	221

Abreviaturas

I. ABREVIATURAS

A

ADNc	ADN complementario
AFP	Alfafetoproteína
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNc	ARN complementario
ARNr	ARN ribosómico
ASCO	Sociedad Americana de Oncología Clínica

C

CA 125	Antígeno carbohidrato 125
CA19-9	Antígeno carbohidrato 19-9
CEA	Antígeno carcinoembrionario
Ct	Ciclo umbral

E

EBRT	Radiación externa
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
ERCP	Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica
ESMO	Sociedad Europea para Oncología Médica
EUS	Ecografía endoscópica o ultrasonidos endoscópico

F

FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos
-----	-------------------------------------

G

GDP	Guanosín difosfato
GEM	Gemcitabina
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GMP	Guanosín monofosfato
GTP	Guanosín trifosfato

I

IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
IMP	Inosina monofosfato
IMRT	Radioterapia de intensidad modulada
IPMN	Neoplasia mucinosa papilar intraductal

L

LDH	Lactato deshidrogenasa
-----	------------------------

M

MCN	Neoplasia quística mucinosa
MDTC	Tomografía computarizada multidetectora o multicorte

ABREVIATURAS

MGED	Sociedad de datos de Expresión Génica de Microarrays
MRI	Imagen por resonancia magnética
MUC	Mucina

N

nab-paclitaxel	Paclitaxel unido a albúmina
NIH	Instituto Nacional de Salud
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas

P

PanIN	Neoplasia intraepitelial pancreática
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreático
PET	Tomografía de emisión de positrones
PS	<i>Performance status</i>
PSA	Antígeno específico de próstata

Q

qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
QRT	Quimiorradioterapia
QT	Quimioterapia

R

RT	Radioterapia
R0	Resección completa

S

SABR	Radioterapia estereotáctica ablativa
SLAM	Molécula activadora de la señalización de linfocitos
SR	<i>Skin rash</i> o rash en la piel

T

TC	Tomografía computarizada
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T <i>helper</i>
TILs	Linfocitos infiltrantes tumorales
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
Tregs	Linfocitos T reguladores

3

3D-CRT	Radioterapia conformacional tridimensional
--------	--

5

5FU	5-fluorouracilo
-----	-----------------

Resumen

II. RESUMEN

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es el tipo histológico de cáncer de páncreas más común, representando aproximadamente el 90% de los casos. A pesar de presentar una baja incidencia respecto a otros tumores, constituye la séptima causa de muerte por cáncer a nivel mundial, siendo sus tasas de supervivencia a 1 y 5 años del 29% y 7%, respectivamente. La detección temprana de esta patología es la mejor estrategia para mejorar estas cifras. Sin embargo, la ausencia de síntomas específicos y de biomarcadores diagnósticos precisos conduce, en la mayoría de los casos, a su diagnóstico tardío. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores altamente sensibles y específicos para esta enfermedad.

Por otra parte, la diversidad en las plataformas de microarrays disponibles y los distintos protocolos de experimentación empleados en los estudios de expresión génica, hacen que en muchos casos, los conjuntos de datos generados sean muy heterogéneos. Esto hace del descubrimiento de biomarcadores basados en expresión génica una tarea difícil, por lo que es necesario desarrollar modelos capaces de comparar los resultados obtenidos en distintos estudios.

En primer lugar, nuestro trabajo de investigación ha pretendido identificar nuevos biomarcadores para PDAC en muestras de sangre periférica que nos permitieran diferenciar a estos pacientes de individuos sanos. Para ello, analizamos el perfil de expresión génica en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de pacientes con PDAC e individuos sanos (18 pacientes con PDAC y 18 controles). A partir de los resultados obtenidos, seleccionamos los 4 genes más relevantes (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1* e *IRAK3*) para validarlos mediante PCR a tiempo real (qPCR) en el mismo grupo de muestras. Posteriormente, evaluamos la capacidad diagnóstica de este panel de genes en un estudio ciego con una nueva cohorte de muestras independiente (15 pacientes con PDAC y 15 controles sanos). Nuestros resultados demostraron que el análisis combinado de *CLEC4D* e *IRAK3* podía

identificar a los pacientes con PDAC con una precisión del 93%, proporcionando una sensibilidad del 86% y una especificidad del 100%.

En segundo lugar, con objeto de identificar genes expresados diferencialmente que pudieran distinguir entre pacientes con PDAC e individuos sanos, comparamos dos conjuntos de datos obtenidos a partir de distintas plataformas de microarrays, Affymetrix e Illumina. Para ello, realizamos un metaanálisis integrativo a partir de dos poblaciones diferentes de pacientes con PDAC (de 18 y 36 individuos) y la misma población control (18 personas sanas). Los resultados obtenidos nos permitieron identificar 5 genes (*FAIM3*, *IRAK3*, *DENND2D*, *PLBD1* y *AGPAT9*) expresados diferencialmente tanto en los dos estudios individuales (Affymetrix e Illumina) como en el metaanálisis integrativo. Además, pudimos detectar 28 genes que mostraron diferencias de expresión significativas tras el metaanálisis pero no en los estudios individuales (“genes ganados”). Varios de estos genes se han relacionado con tumores del sistema digestivo en otras investigaciones, lo que apoya el potencial de esta tecnología para el descubrimiento de biomarcadores tumorales.

En conjunto, estos resultados demuestran que el perfil de expresión génica de PBMCs en pacientes con PDAC podría ser una acertada herramienta para su diagnóstico. En nuestro trabajo sugerimos un panel biomarcador constituido por 4 genes que podría ser de utilidad para el diagnóstico de PDAC. Además, el metaanálisis integrativo representa una estrategia ventajosa para la combinación de varios conjuntos de datos relacionados con PDAC, revelando nuevos genes que podrían jugar un papel importante en esta enfermedad.

En tercer lugar, uno de los aspectos más relevantes en el fracaso de la terapia frente a PDAC es el desarrollo de resistencia a los actuales tratamientos. Erlotinib, uno de los fármacos aprobados para el tratamiento del PDAC, es un inhibidor de la tirosina quinasa asociada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual se encuentra sobrerregulado en la mayoría de estos pacientes. El efecto secundario más común de erlotinib es el desarrollo de rash en la piel (SR), cuya aparición se ha asociado con mejor respuesta terapéutica al fármaco. En este contexto y dado el potencial de la

tecnología de microarrays para el descubrimiento de biomarcadores, otro de los objetivos de nuestro trabajo fue identificar genes relacionados con la aparición de SR en pacientes con PDAC tratados con erlotinib. Para ello, realizamos un estudio basado en microarrays de expresión génica empleando PBMCs de pacientes con PDAC (34 pacientes) obtenidas antes de la administración del fármaco. Un total de 21 pacientes desarrollaron SR mientras que el resto (13 pacientes) fueron negativos para SR. De la comparación de ambos grupos, pudimos identificar 7 genes (*FAM46C*, *IFITM3*, *GMPR*, *DENND6B*, *SELENBP1*, *NOL10* y *SIAH2*) que mostraron una expresión significativamente menor en los pacientes con SR. Estos datos sugieren la existencia de un perfil de expresión génica correlacionado con la aparición de SR inducida por erlotinib en pacientes con PDAC, el cual podría ser empleado como un indicador predictivo de respuesta al tratamiento en estos pacientes.

Summary

III. SUMMARY

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common form of pancreatic cancer, comprising 90% of all diagnosed cases. Despite its moderate incidence compared to other carcinomas, PDAC is the seventh most frequent cause of death from cancer worldwide, with 1- and 5-year survival rates of 29% and 7%, respectively. Fast detection of PDAC appears to be the most relevant strategy to improve the long-term survival of the patients. However, the majority of the cases are diagnosed at advanced stages mainly due to the absence of specific symptoms and to the lack of reliable biomarkers for population screening. Consequently, novel, highly sensitive and specific biomarkers for the diagnosis of PDAC are urgently needed.

On the other hand, searching for differentially expressed genes to identify feasible biomarkers for PDAC can be a hard task given the wide range of available microarray platforms and different experimental protocols applied. Therefore, it is necessary to establish models able to compare datasets from different studies. In this regard, integrative meta-analysis can significantly improve the reliability and robustness of differentially expressed genes detection methodologies.

The first objective of this work was to identify new biomarkers in peripheral blood that can differentiate between PDAC patients and healthy controls. For this purpose, initially, we analyzed the gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from PDAC patients (n=18) and healthy controls (n=18). From the results obtained, 4 genes were selected as the most relevant in our research (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1* and *IRAK3*) and were validated by real-time quantitative PCR (qPCR) in the same set of samples. Once our predictor set of genes was established, it was tested in a blinded set of new peripheral blood samples (15 PDAC patients and 15 healthy individuals), which confirmed the previously observed changes. Our results showed that the combination of *CLEC4D* and *IRAK3* predicted the diagnosis of PDAC with an accuracy of 93 %, providing a sensitivity of 86% and a specificity of 100%.

Secondly, in order to identify differentially expressed genes that may represent potential biomarkers for this disease, we compared two gene expression datasets collected from two different microarray platforms, namely Affymetrix and Illumina. To this end, we analyzed PBMCs samples from two cohorts of PDAC patients, which included 18 and 36 patients, as well as from 18 healthy controls, using both microarray platforms. A meta-analysis based on an empirical Bayesian methodology (ComBat) was then proposed to integrate these datasets avoiding bias between the two platforms. After our integrative meta-analysis, 5 genes were commonly identified within the individual analyses of the independent datasets. In addition, 28 novel genes that were not previously reported by the individual analyses ('gained' genes) were also discovered. Several of these gained genes have been already related to other gastroenterological tumors, supporting the potential of this technology for the discovery of tumor biomarkers.

Taken together, these results demonstrate that gene expression profiling of PBMCs could be a good tool for the diagnosis of PDAC. We present a validated 4-gene predictor set that may be useful in PDAC diagnosis. Also, the proposed integrative meta-analysis has shown to be a specially advantageous approach for combining several datasets related to PDAC, revealing novel genes that may play an important role in PDAC.

Resistance to current treatments is other of the most important aspects concerning PDAC, leading to disappointing survival rates. This clinical outlook substantiates the need for more effective therapeutic approaches in the management of these patients. In this sense, immunotherapy strategies are being the subject of numerous clinical trials involving PDAC patients. Besides, the search for reliable biomarkers with diagnostic and predictive value may facilitate the monitoring and refinement of therapies.

One of the drugs approved in the management of metastatic PDAC is erlotinib, an epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, frequently overexpressed in PDAC. The drug's most frequently reported side effect, as a result of EGFR inhibition, is skin rash (SR), a symptom which has been associated with a better therapeutic response to the drug. In this context,

the gene expression profiling can be used as a tool to predict which patients will develop this important cutaneous manifestation. Thus, another aim of the present study was to identify which genes may influence the appearance of SR in PDAC patients. Before administering any chemotherapy regimen and the development of SR, we collected PBMCs samples from 34 PDAC patients treated with erlotinib: 21 patients developed SR while 13 patients did not (controls). These samples were studied in order to identify a differential gene expression pattern. Our results showed 7 genes (*FAM46C*, *IFITM3*, *GMPR*, *DENND6B*, *SELENBP1*, *NOL10* and *SIAH2*) which were downregulated in PDAC patients with SR. Our results suggest the existence of a gene expression profile significantly correlated with erlotinib-induced SR in PDAC that could be used as an indicator of the response to the treatment in these patients.

Introducción

IV. INTRODUCCIÓN

1. Páncreas: nociones anatómicas y fisiológicas

Anatómicamente, el páncreas es un órgano impar, de morfología alargada en sentido transversal y mucho más voluminoso en su extremo derecho que en el izquierdo. Forma parte del contenido del espacio retroperitoneal, donde se extiende entre el asa duodenal y el bazo, quedando dorsal al cuerpo del estómago y ventral a la columna vertebral (nivel de L1-L2) y músculos de la pared abdominal posterior. Esta localización hace de este órgano uno de los de más difícil exploración, ya sea mediante técnicas de palpación o de imagen. Su inaccesibilidad es, desde el punto de vista clínico, de gran relevancia tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de las patologías que le afectan.

Su morfología ha hecho que clásicamente se distingan en el tres porciones anatómicas diferenciadas denominadas de derecha a izquierda cabeza, cuerpo y cola. La primera, ancha y parcialmente rodeada por la C duodenal, se caracteriza por presentar un relieve craneal (*tuber omentale*) que representa el límite con el cuerpo, y una escotadura inferior (incisura pancreática) que permite el paso de los vasos mesentéricos craneales. La pequeña porción de páncreas situada por detrás de estos vasos se denomina proceso unciforme. La segunda porción o cuerpo del páncreas, porción central, se prolonga sin solución de continuidad con la tercera porción o cola del páncreas, que constituye la zona más estrecha del órgano y la que realmente entra en contacto con el bazo [1].

El sistema excretor del páncreas está constituido por los conductillos intercalares, que reuniéndose de forma progresiva en conductos cada vez de mayor calibre, terminan por formar un gran conducto central que recorre el eje longitudinal del páncreas y que se denomina conducto principal o de Wirsung. Su desembocadura, junto al colédoco, se produce en la segunda porción duodenal originando un relieve denominado ampolla de Vater o papila duodenal mayor. La parte proximal del páncreas dorsal suele conservar un conducto propio que desemboca por encima del anterior (conducto accesorio o de Santorini) que da lugar a una nueva papila ahora denominada papila

duodenal menor. Aunque habitualmente se origina a partir del conducto principal, desde el punto de vista anatómico, existen variaciones respecto a la disposición de ambos conductos [1, 2].

La localización retroperitoneal del páncreas y su disposición alargada hace que este órgano presente gran cantidad de relaciones anatómicas, de gran relevancia desde el punto de vista de la sintomatología, pronóstico y tratamiento, especialmente quirúrgico, para los pacientes que presentan una afección del mismo. Así, cabe destacar la estrecha relación que el cuerpo y la cola del páncreas presentan con la aorta abdominal y los vasos renales izquierdos y la que presenta la cabeza del páncreas, no sólo con el duodeno, sino también con el riñón izquierdo y la vena cava caudal, entre otras.

Por último y en relación a la vascularización del páncreas, cabe destacar su vascularización arterial y venosa, dependientes de la arteria hepática y vena porta, respectivamente, y su red linfática, de gran importancia clínica y que le conecta con las cadenas esplénica, hepática y mesentérica.

Desde un punto de vista fisiológico, el páncreas puede considerarse una glándula mixta con tejido exocrino y endocrino (Figura 1) que representan el 80-85% y el 2% respectivamente, de su volumen total. Los vasos y la matriz extracelular representan tan sólo un 10-15% de dicho volumen [3]. El páncreas exocrino está constituido por los acinos pancreáticos que a su vez están formados por células acinares, centroacinares y ductales. Su secreción es recogida por un sistema ductal que, como ya se ha comentado, termina fusionándose para dar lugar al conducto pancreático principal. Dicha secreción está constituida básicamente por enzimas que intervienen en el proceso digestivo [3]. El tejido endocrino, disperso entre el tejido exocrino aunque más abundante en la cola del páncreas, se encarga de secretar hormonas involucradas fundamentalmente en la homeostasis de la glucosa [4]. La unidad funcional del páncreas endocrino son los islotes de Langerhans, constituidos por varios tipos celulares, siendo los 4 tipos principales: 1) células alfa o A, secretoras de glucagón (15-20% de las células del islote), 2) células beta o B, secretoras de insulina (60-80%), 3) células delta o D, secretoras de somatostatina (5-10%) y 4) células F o PP, secretoras de polipéptido

pancreático (<1%). Además, en la periferia de los islotes de Langerhans existe un tipo celular con características similares a las células de Schwann que representa menos del 1% de su masa y que se ha relacionado con su regeneración [4].

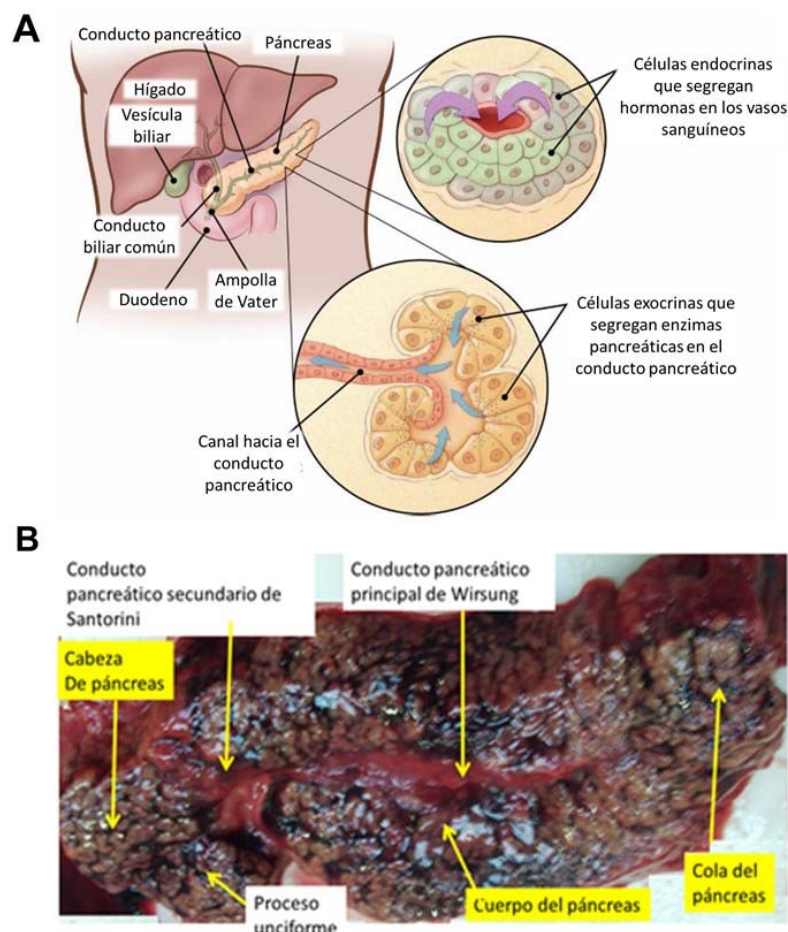


Figura 1. Localización e histología del páncreas (A). Imagen obtenida de *American Cancer Society: Pancreatic cancer* [5]. Morfología del páncreas (B). Imagen obtenida de “Manual de Anatomía Humana para Nutrición y Dietética”. J. Prados. 2015.

2. Neoplasias del páncreas

Los tumores pancreáticos comprenden un amplio espectro de patologías que incluyen desde lesiones benignas hasta cánceres muy agresivos, pasando por tumores *borderline* o de potencial maligno incierto [6]. Su apariencia macroscópica permite distinguir entre tumores sólidos y quísticos [7] que pueden originarse en células ductales, acinares y/o endocrinas, lo que

condiciona su tratamiento y pronóstico [5]. La Tabla 1 resume los tipos de neoplasias pancreáticas exocrinas y endocrinas.

Generalmente, los cánceres pancreáticos se desarrollan a partir del componente exocrino y más concretamente del epitelio ductal. De hecho, la mayoría de los cánceres de páncreas son adenocarcinomas ductales (PDAC). Por el contrario, los desarrollados a partir de células acinares son poco frecuentes [5]. Los tumores del tejido pancreático endocrino, también conocidos como tumores pancreáticos neuroendocrinos o tumores de células del islote, son mucho menos comunes que los anteriores (menos del 5% de los casos). Podemos distinguir entre tumores endocrinos bien y pobremente diferenciados, lo que a su vez se ha asociado a su grado tumoral. Los bien diferenciados se correlacionan con grados tumorales bajos e intermedios, mientras que los pobremente diferenciados se asocian a neoplasias de alto grado tumoral [8]. En general, los pacientes con neoplasias del páncreas endocrino cuentan con un pronóstico favorable, ya que suele tratarse de tumores bien diferenciados, con síntomas tempranos que permiten un diagnóstico precoz. De hecho, incluso el curso clínico de los casos metastásicos suele ser prolongado. Los tumores pancreáticos endocrinos pobremente diferenciados son menos frecuentes aunque poseen una gran agresividad y por tanto peor pronóstico [9]. Por otra parte, aproximadamente la mitad de estos tumores muestran sintomatología relacionada con el aumento de los niveles sanguíneos de hormonas pancreáticas (tumores funcionales), denominándose en base a la hormona secretada y siendo los más comunes el insulinoma y el gastrinoma. Los tumores endocrinos no funcionales no suelen cursar con sintomatología temprana y tienen más probabilidades que los funcionales de ser malignos [5].

Por último, los otros componentes del páncreas (fibroblastos, vasos, etc.) también son susceptibles de la transformación maligna, quedando además un grupo de tumores de origen indeterminado [9].

Tumores epiteliales	
Benignos	
Cistoadenoma de células acinares	
Cistoadenoma seroso	
Lesiones premalignas	
Neoplasia intraepitelial pancreática, grado 3 (PanIN-3)	
Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) con grado de displasia bajo o intermedio	
Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) con alto grado de displasia	
Neoplasia tubulopapilar intraductal (ITPN)	
Neoplasia quística mucinosa (MCN) con grado de displasia bajo o intermedio	
Neoplasia quística mucinosa (MCN) con alto grado de displasia	
Malignos	
Adenocarcinoma ductal	
<i>Carcinoma adenoescamoso</i>	
<i>Adenocarcinoma mucinoso</i>	
<i>Carcinoma hepatoide</i>	
<i>Carcinoma medular</i>	
<i>Carcinoma de células en anillo de sello</i>	
<i>Carcinoma indiferenciado</i>	
<i>Carcinoma indiferenciado con células tipo osteoclastos</i>	
Carcinoma de células acinares	
Cistoadenocarcinoma de células acinares	
Carcinoma mucinosos papilar intraductal (IPMN) con un carcinoma invasivo asociado	
Carcinoma ductal-acinar mixto	
Carcinoma acinar-neuroendocrino mixto	
Carcinoma acinar-neuroendocrino-ductal mixto	
Carcinoma ductal-neuroendocrino mixto	
Neoplasia quística mucinosa (MCN) con un carcinoma invasivo asociado	
Pancreatoblastoma	
Cistoadenocarcinoma seroso	
Neoplasia sólida pseudopapilar	
Neoplasias neuroendocrinas	
Microadenoma neuroendocrino pancreático	
Tumor neuroendocrino de grado 1 (NET G1)	
Tumor neuroendocrino de grado 2 (NET G2)	
Carcinoma neuroendocrino	
<i>Carcinoma neuroendocrino de células grandes</i>	
<i>Carcinoma neuroendocrino de células pequeñas</i>	
Tumor neuroendocrino (NET) de células enterocromafines (EC) (productor de serotonina)	
Gastrinoma maligno	
Glucagonoma maligno	
Carcinoma productor de insulina (insulinoma)	
Somatostatina maligno	
Vipoma maligno	

Tabla 1. Clasificación de los tumores pancreáticos exocrinos y endocrinos de la Organización Mundial de la Salud (WHO). Modificado de *WHO Classification of Tumours of the Digestive System 2010* (<http://www.pathologyoutlines.com/topic/pancreaswho.html>).

3. Adenocarcinoma ductal de páncreas

Como hemos mencionado previamente (ver apartado 2. Neoplasias del páncreas), el PDAC representa aproximadamente el 90% de los casos de cáncer de páncreas [10], por lo que existe una identificación del término “cáncer de páncreas” con este tipo tumoral [9].

A nivel macroscópico, el PDAC forma masas de color blanquecino o amarillento que suelen obstruir y por tanto dilatar los conductos pancreáticos y biliares [7]. Es una neoplasia de tipo epitelial infiltrante, invasiva y con diferenciación glandular. Histológicamente se caracteriza por una disposición desordenada de las glándulas, pleomorfismo nuclear, lámina glandular incompleta, necrosis luminal, glándulas neoplásicas adyacentes a los vasos e invasión perineural, linfática y vascular [11]. Puede presentarse como bien, moderada o pobremente diferenciado, pero es muy común encontrar elementos bien y pobremente diferenciados dentro del mismo tumor. No obstante, existen variantes morfológicas del PDAC [12]. Por último, el PDAC se caracteriza por una intensa reacción desmoplásica, con la presencia de un tejido estromal que puede llegar a suponer el 80% de la masa tumoral [13, 14] y que influye tanto en el proceso tumoral como en el pronóstico del paciente [15].

Respecto a su localización, la mayoría de los PDAC (60-70%) ocupan la cabeza del páncreas [16]. Son estos los que pueden desarrollar síntomas relacionados con la obstrucción de los conductos pancreáticos y/o biliares evidenciando signos clínicos que ayudan a diagnosticarlos. Por el contrario, los tumores situados en otras localizaciones (cuerpo y cola del páncreas), cursan con síntomas difusos por lo que suelen detectarse en fases más avanzadas de la enfermedad [17].

3.1. Epidemiología

El PDAC debe ser considerado como una neoplasia de baja frecuencia y de incidencia moderada respecto a otros tipos tumorales sólidos. Constituye aproximadamente el 2,1% de los tumores diagnosticados en España, lo que supone unos 4.000 casos nuevos/año [18]. Sin embargo, su tasa de mortalidad es muy similar a la de incidencia. A pesar de ser el décimo segundo cáncer

más común, representa la séptima causa de muerte por cáncer a nivel mundial [19] y la cuarta en Estados Unidos [20] y Europa, por detrás de los cánceres de pulmón, colon, próstata en hombres y mama en mujeres [21]. Según la *American Cancer Society*, en 2016 se diagnosticarán 53.070 nuevos casos de cáncer de páncreas en Estados Unidos (aproximadamente 27.670 en hombres y 25.400 en mujeres), con una estimación de 41.780 muertes debidas a la enfermedad (21.450 hombres y 20.330 mujeres) [22]. Además, las cifras de incidencia y mortalidad para esta enfermedad se han incrementado ostensiblemente en los últimos años. Concretamente, desde el año 2000 al 2012, se ha producido un aumento en las tasas de incidencia y mortalidad del 1,2% y 0,4% por año, respectivamente [22]. Las previsiones para el año 2030, sitúan al PDAC como la segunda causa de muerte por cáncer en Estados Unidos, sólo por detrás del cáncer de pulmón [23].

3.2. Factores de riesgo

La causa o causas que originan el desarrollo de un PDAC son aún desconocidas [24], aunque los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha han permitido determinar varios factores de riesgo asociados a esta neoplasia. Entre ellos, destacan los siguientes:

Edad

La probabilidad de padecer esta enfermedad aumenta a partir de los 55 años [25], siendo la media de edad de los pacientes en el momento de su diagnóstico 66 años. Menos del 10% de los casos se diagnostican en edades más tempranas [26].

Sexo

La incidencia de PDAC es ligeramente mayor en hombres que en mujeres. No obstante, la incidencia en mujeres ha aumentado notablemente en las últimas décadas, reduciéndose la diferencia entre ambos sexos. Este fenómeno ha sido atribuido al aumento del hábito tabáquico entre las mujeres [5].

Tabaco

El tabaco es uno de los principales factores de riesgo establecidos para el desarrollo de PDAC [20]. Sabemos que la incidencia de esta enfermedad se incrementa a medida que aumentan el consumo y la duración del hábito de fumar [27]. Se estima que alrededor del 25% de los casos de PDAC se deben al consumo de tabaco [28]. Las cifras indican que aumenta el riesgo en un 75% respecto a los no fumadores y que este riesgo persiste al menos 10 años después de abandonar el hábito de fumar [29], reduciéndose en un 30% a partir de ese momento [27].

Alcohol

La posible asociación entre el riesgo de PDAC y la ingesta de alcohol no está totalmente dilucidada debido a la disparidad de los resultados obtenidos en las distintas investigaciones realizadas hasta la fecha [30]. En general, se considera que un consumo moderado de alcohol no aumenta el riesgo de PDAC. De hecho, la mayor parte de los estudios realizados no detectan asociación incluso con elevadas ingestas de alcohol [31-36], aunque otros sí relacionan un consumo diario elevado con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad [37-40]. Por otro lado, el consumo de alcohol se ha asociado con el riesgo de sufrir pancreatitis [41] y diabetes *mellitus* tipo II [42], enfermedades ambas que se correlacionan con el riesgo de padecer PDAC [24, 43].

Dieta

La asociación entre los hábitos alimenticios y el desarrollo tumoral se ha puesto de manifiesto en distintos tipos de cáncer [44, 45], incluyendo los del sistema digestivo. En el caso del PDAC, una dieta poco saludable, basada en la ingesta de grasas saturadas, carnes rojas y alimentos procesados, se ha asociado al riesgo de desarrollar la enfermedad [30, 46]. Por el contrario, una dieta sana, con un elevado consumo de frutas, verduras, frutos secos, folato y un consumo de calorías equilibrado podría jugar un papel protector frente a esta neoplasia [47, 48].

Obesidad

El exceso de tejido adiposo se ha relacionado con el desarrollo de PDAC, y un elevado índice de masa corporal ($>30 \text{ Kg/m}^2$) se ha demostrado que incide en una mayor tasa de mortalidad en los enfermos con PDAC (20-40%) [17].

Pancreatitis crónica

La pancreatitis crónica es uno de los factores de riesgo más estudiados en el desarrollo de PDAC. Se le atribuyen alrededor del 3% de los casos [49], aunque el mecanismo por el que puede desencadenar la patología tumoral aún no se ha esclarecido [24]. Los hábitos alcohólico y tabáquico constituyen importantes factores de riesgo en el desarrollo de la pancreatitis crónica (40% y 25%, respectivamente) [28], y se estima que estos pacientes albergan alrededor de 13 veces más riesgo de desarrollar PDAC [50]. No obstante, aunque la mayoría de los casos de PDAC cursan sin desarrollo de pancreatitis crónica, se ha visto que en algunos casos la presencia de tumor pancreático es la causa de la enfermedad. Se recomienda pues, que en los pacientes con pancreatitis crónica idiopática que no hayan sido consumidores habituales de alcohol y/o tabaco, se evalúe la posible existencia de PDAC [51].

Diabetes *mellitus*

La alteración del metabolismo de la glucosa se relaciona con mayor riesgo de cáncer de páncreas [52] y se ha sugerido que elevadas concentraciones de insulina en el microambiente de las células ductales pancreáticas podrían contribuir a su transformación maligna [53]. Varios estudios, la mayoría centrados en la diabetes *mellitus* tipo II, han puesto de manifiesto la asociación existente entre diabetes *mellitus* y el desarrollo de PDAC. No obstante, estudios con pacientes afectados de diabetes *mellitus* tipo I otorgan un riesgo relativo similar (entre 1,5-2) para ambos tipos de diabetes [54-56]. De hecho, se ha sugerido la posible utilidad de esta enfermedad como biomarcador de PDAC en fase temprana [57], ya que se estima que la hiperglucemia causada por esta neoplasia ocurre aproximadamente dos años

antes que los síntomas que hacen sospechar y finalmente diagnosticar el cáncer pancreático [58].

Infecciones

La exposición a determinados agentes infecciosos como el *Helicobacter pylori*, el virus de la hepatitis B o el virus de inmunodeficiencia humana se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollar PDAC [17].

Componente hereditario

El 80% de los cánceres pancreáticos son esporádicos y solo una pequeña proporción de ellos (5-10%) tienen un componente hereditario [15]. Existen varias mutaciones en la línea germinal que se han asociado a mayor riesgo de desarrollar PDAC, destacando las mutaciones en *BRCA2*, que constituye el desorden hereditario más común, *p16/CDKN2*, *ATM*, *STK11*, *PRSS1/PRSS2*, *SPINK1*, *PALB2* y genes relacionados con la reparación del ADN [23]. Considerando la historia familiar de cáncer de páncreas, se consideran individuos de riesgo aquellos que tienen parientes de primer grado que han sufrido la enfermedad, aumentando sustancialmente el riesgo con el número de parientes afectados [59, 60]. Además, existen varios síndromes familiares relacionados con un mayor riesgo de desarrollar esta patología (Tabla 2).

Grupo sanguíneo

Respecto a las neoplasias pancreáticas, se ha observado que los pacientes con grupos sanguíneos A, B o AB, presentan mayor riesgo de sufrir la enfermedad que el grupo O. Se ha sugerido que el grupo B es el que presenta mayor riesgo, seguido por los grupos A y AB, que muestran un riesgo intermedio. No obstante, determinar su influencia en el riesgo de PDAC requiere de más investigaciones [61].

Predisposición heredada a PDAC	Gen afectado	Riesgo de PDAC hasta los 70 años (%)
Síndrome de Peutz–Jeghers	<i>LKB1</i>	36
Síndrome de melanoma familiar con lunares atípicos múltiples	<i>CDKN2, CDK4</i>	17
Síndrome de cáncer hereditario de mama y de ovario	<i>BRCA1, BRCA2</i>	3-8
Síndrome de Li–Fraumeni	<i>TP53</i>	<5
Síndrome de Lynch	<i>MLH1, MLH2</i>	<5
Poliposis adenomatosa familiar	<i>APC</i>	<5
Pancreatitis hereditaria	<i>PRSS1, SPINK1</i>	40
Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	<5
Cáncer de páncreas familiar	<i>BRCA2, PALB2, ATM</i>	8-12 (2 FPG) 16-38 (> 3FPG)

Tabla 2. Patologías hereditarias que incrementan el riesgo de cáncer de páncreas. *Abreviaturas:* PDAC, adenocarcinoma ductal pancreático; FPG, familiares de primer grado afectados. Modificado de Bartsch y cols. [60].

Exposición a agentes químicos

Existen diferentes sustancias químicas que se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, como son el clorobenzoilo, los hidrocarburos clorados, el níquel, los compuestos de níquel y cromo y el polvo de sílice, entre otras [62].

3.3. Pronóstico

El PDAC suele ser asintomático o mostrar síntomas inespecíficos, por lo que en la mayoría de los casos (80%) se diagnostica de forma tardía presentando extensión a otras regiones. Esta extensión suele afectar a estructuras de vital importancia debido a la localización del páncreas (ver apartado 1. Páncreas: nociones anatómicas y fisiológicas) por lo que en la mayor parte de los pacientes el pronóstico es muy pobre y con escasas posibilidades de resección quirúrgica [7,63]. A pesar de los últimos avances realizados en el diagnóstico [64] y tratamiento del PDAC, las tasas de supervivencia después de 1 y 5 años de su diagnóstico, continúan siendo muy bajas, situándose en torno al 29% y 7%, respectivamente [22]. Por otra parte,

de los pacientes candidatos a una resección quirúrgica curativa (alrededor del 20% de los casos), sólo el 25% sobrevive 5 años tras la cirugía, ya que suele darse recurrencia de la enfermedad [11].

3.4. Sintomatología y diagnóstico: marcadores tumorales

De forma resumida podemos decir que los síntomas que acontecen en el curso del PDAC dependen en gran medida de la localización del tumor y de su fase tumoral [65]. Así, los tumores localizados en la cabeza del páncreas suelen producir síntomas debidos a la obstrucción de los conductos pancreático y/o biliar, los cuales no suelen producirse en tumores localizados en la cola, dificultando el diagnóstico de estos últimos [17]. En general, los principales síntomas que pueden presentar los enfermos con PDAC son ictericia, dolor abdominal que puede irradiarse a la espalda y hombros, pérdida de peso, cambios en los hábitos intestinales como esteatorrea, diabetes *de novo*, náuseas, vómitos, distensión abdominal, disfagia, prurito y astenia, entre otros [26, 66]. En los cánceres avanzados, la diabetes y el dolor abdominal son síntomas altamente frecuentes, produciéndose en el 97% y 78-82% de los casos, respectivamente [67]. Por otro lado, el dolor de espalda y hombros, la disfagia, los trastornos intestinales y la astenia están presentes más de 6 meses antes del diagnóstico [66].

Hoy en día, las técnicas de imagen constituyen la principal herramienta en el diagnóstico de PDAC. No obstante, ciertos análisis de sangre pueden jugar un papel importante en la detección del tumor [68]. En el caso de tumores resecables, a menudo no se considera necesaria la extracción de una biopsia previa a la resección; sin embargo, la confirmación histológica sí es necesaria en el caso de pacientes que van a ser sometidos a tratamiento y cuando el diagnóstico es incierto [55, 64].

3.4.1. Técnicas de imagen

Múltiples técnicas de imagen [5] pueden ser usadas para el diagnóstico del PDAC y para la determinación de su extensión, aspecto este esencial para la determinación de los tumores quirúrgicamente extirpables. De hecho, la

detección de metástasis (i.e. hepáticas y peritoneales) es una contraindicación para la resección [64].

La tomografía computarizada (TC) multidetectora o multicorte (MDTC) es la técnica de elección cuando existe una marcada sospecha de PDAC ya que aporta una buena resolución espacial y amplia cobertura anatómica [69]. Para mayor eficacia diagnóstica es importante el empleo de un protocolo pancreático con el que visualizar tanto los vasos peripancreáticos, como el parénquima pancreático y el hígado [64]. Aunque este protocolo puede variar, en general se recomienda un estudio dinámico bifásico con fase pancreática [70], que permite detectar el PDAC [71] y estudiar la posible invasión de arterias y venas peripancreáticas [72], seguida de una fase venosa portal, para la detección de posibles metástasis hepáticas y visualización de la vena mesentérica superior [71]. La MDTC es útil para determinar la posibilidad de resección quirúrgica, ayudando a identificar si ha habido propagación tumoral e invasión vascular [56]. Su sensibilidad diagnóstica se sitúa entre el 89-97%. No obstante, su mayor sensibilidad se obtiene en tumores de mayor tamaño, ya que cuando se trata de lesiones pequeñas (≤ 1.5 cm) esta sensibilidad disminuye notablemente (67%) [64]. Otro inconveniente añadido se relaciona con su potencial para predecir la resecabilidad del tejido que es menor del 50%. Además, esta técnica posee una capacidad limitada para caracterizar metástasis hepáticas o peritoneales de pequeño tamaño (< 1 cm). Algunos estudios sugieren que la detección de metástasis ganglionares mediante MDTC también es limitada, ya que el criterio empleado es el tamaño ganglionar, y no siempre un mayor tamaño implica lesión metastásica y viceversa [64].

La ecografía abdominal es una técnica de imagen que no requiere el uso de radiación, su realización es sencilla, segura y no invasiva. Suele emplearse como herramienta de diagnóstico diferencial, cuando no está claro si el origen de los síntomas es la presencia de un tumor pancreático u otra patología [5, 50]. Es una técnica útil para detectar obstrucción del tracto biliar. Sin embargo, debido a su localización retroperitoneal, esta técnica no permite una clara visualización de la glándula [64, 73], lo que dificulta la detección de las lesiones. Su precisión depende en gran medida, de la experiencia del operador

y del tamaño tumoral, por lo que muestra un amplio rango de sensibilidad en la detección del PDAC (50-90%). Además, se trata de una técnica con escasa capacidad para detectar lesiones tumorales pequeñas, constituyendo una herramienta de utilidad limitada a nivel diagnóstico y en la estadificación de esta patología [69].

El empleo de resonancia magnética (MRI) en el diagnóstico de tumores pancreáticos está aumentando [53], no obstante, la TC sigue siendo la técnica de imagen más empleada [74], a pesar de que ambas han mostrado una precisión similar [75], siendo la MRI más sensible para la detección de pequeñas metástasis [17]. Como ya se ha demostrado, el diagnóstico parece mejorar combinando ambas técnicas [64].

La ecografía endoscópica o ultrasonidos endoscópico (EUS) es una herramienta de evaluación del PDAC. Entre sus ventajas se incluyen la posibilidad de obtención de imágenes de alta resolución del páncreas y estructuras cercanas, y la capacidad de detectar lesiones pequeñas (de 2-3 mm) [64]. Muestra una sensibilidad diagnóstica cercana al 100%, siendo útil en la detección de invasión vascular (85% de sensibilidad y 91% de especificidad) y predicción de reseccabilidad (90% y 86% de sensibilidad y especificidad, respectivamente) [64, 76]. Otra de sus ventajas es que posibilita la obtención de una biopsia guiada en tiempo real. Todo esto hace que sea una técnica muy utilizada en la estadificación del cáncer de páncreas [17]. Entre sus desventajas destaca su baja capacidad para detectar metástasis en los ganglios linfáticos (69% de sensibilidad y 81% de especificidad) [75], su carácter invasivo, su limitada disponibilidad y el que los resultados dependen en gran medida de la experiencia y pericia del operador [64]. En general, y a pesar de que la EUS se ha mostrado superior a la TC en varios aspectos, como su mayor poder de detección de tumores pancreáticos y mayor precisión en la estadificación del tumor, esta última es la técnica de imagen más utilizada ante un posible caso de PDAC [64].

La colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP) es una técnica que muestra la anatomía de los conductos pancreático y biliar, pudiendo ser utilizada para guiar la biopsia [65]. Cuenta con una elevada sensibilidad

diagnóstica (90-95%). Sin embargo, su utilidad ante tumores pequeños es limitada. Además, su carácter invasivo conlleva entre un 5-10% de riesgo de desarrollar complicaciones importantes tales como pancreatitis o perforación gastrointestinal, por lo que no suele aplicarse de forma rutinaria [68].

En algunas circunstancias, como por ejemplo pacientes con síntomas de enfermedad avanzada o con grandes tumores en cuerpo o cola del páncreas, la estadificación por laparoscopia puede resultar de utilidad en la evaluación de metástasis y afectación vascular [56]. Sin embargo, su uso en tumores aparentemente resecables no está muy aceptado [17].

Por último, la tomografía de emisión de positrones (PET) no se encuentra entre las técnicas diagnósticas de rutina y no se recomienda para la estadificación. Además, se ha visto que su combinación con TC no aumenta la sensibilidad en la detección de metástasis [77], mostrando varias desventajas en el diagnóstico de PDAC, como las tasas de falsos negativos y falsos positivos que presenta [11].

3.4.2. Análisis de sangre y biomarcadores tumorales

La posibilidad de encontrar un marcador en sangre para el diagnóstico de procesos tumorales es uno de los principales objetivos de la oncología en nuestros tiempos. En este contexto, existen numerosos biomarcadores tumorales detectables en fracciones sanguíneas y aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) que nos acercan al diagnóstico de diferentes tipos tumorales. Por ejemplo, la detección del antígeno específico de próstata (PSA) en suero es de gran utilidad en el diagnóstico de cáncer de próstata [78], la determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH) está siendo usada para el diagnóstico de linfomas [79], la alfafetoproteína (AFP) es determinada cuando se sospecha hepatocarcinoma [80] y el antígeno carbohidrato 125 (CA 125) en el caso del cáncer de ovario [81].

En PDAC, el único biomarcador sanguíneo aceptado y de uso clínico hasta la fecha es el antígeno carbohidrato 19-9 (CA19-9) sérico, también conocido como antígeno sializado de Lewis [48]. En la actualidad se considera que valores de CA19-9 por encima de 37 U/ml [82] están relacionados con un

empeoramiento del pronóstico [65]. Sin embargo, dadas sus bajas sensibilidad y especificidad (80% y 73%, respectivamente) [83], no se recomienda su uso para el cribado o *screening* de pacientes [84]. De hecho, este biomarcador suele encontrarse en las células del tracto biliar, por lo que patologías no tumorales que afecten a estos tipos celulares (pancreatitis, cirrosis o colangitis, entre otras) pueden conllevar también un aumento del nivel de CA19-9 en suero [68] dando lugar a falsos positivos. Además, aproximadamente un 10% de los pacientes con PDAC son negativos para el antígeno de Lewis, siendo incapaces de sintetizar el marcador incluso en fases avanzadas de la enfermedad [65, 85]. Otra de sus grandes limitaciones es su escasa sensibilidad (55%) frente a lesiones neoplásicas pequeñas (<3 cm) [86], de modo que sólo se detectan niveles séricos de CA19-9 elevados en el 65% de los pacientes con PDAC resecable [87]. Frente a todas estas desventajas, este biomarcador parece tener cierta utilidad pronóstica en la evaluación de la respuesta a la terapia [68] y en la monitorización de los pacientes tras la cirugía. Así, una reducción de más del 50% de los niveles de CA19-9 en respuesta al tratamiento neoadyuvante se ha asociado con una mejor supervivencia global [88, 89]. Sin embargo, alrededor del 20% de los pacientes con niveles menores tras el tratamiento neoadyuvante, tendrán, nuevamente, un aumento de CA19-9 y, de estos, aproximadamente un 50% desarrollarán metástasis [90].

Otros biomarcadores, como el antígeno carcinoembrionario (CEA) y CA 125 han sido usados en el diagnóstico y seguimiento de PDAC, resultando ser menos precisos que el CA19-9. Así, la sensibilidad de CEA y CA 125 se sitúa entre el 30-60%, y la especificidad alrededor del 80% [91].

En resumen, a pesar de que todos estos biomarcadores carecen de la sensibilidad y especificidad adecuadas para el cribado en PDAC, sus niveles en suero pueden tener utilidad pronóstica en el seguimiento de los pacientes, especialmente CA19-9 [68].

3.5. Estadios tumorales

La clasificación de los tumores por estadios permite conocer la extensión de la enfermedad, un factor importante en relación al pronóstico y opciones terapéuticas del paciente. Aunque existen varios sistemas de estadificación tumoral, la clasificación TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) es la más extendida (Tabla 3). Este sistema describe la extensión del tumor primario (T), el estado de los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia de metástasis distante (M), agrupando los tumores en 5 estadios (0, I, II, III y IV) (Tabla 4) [92].

TNM	Criterio
Tumor primario (T)	
Tx	Tumor primario no puede ser evaluado
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado al páncreas \leq 2cm en su dimensión mayor
T2	Tumor limitado al páncreas $>$ 2cm en su dimensión mayor
T3	Extensión del tumor más allá del páncreas, sin afectar al tronco celíaco o a la arteria mesentérica superior
T4	Tumor afecta al tronco celíaco o a la arteria mesentérica superior (irreseccable)
Ganglios linfáticos regionales (N)	
Nx	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	No metástasis en ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en ganglios linfáticos regionales
Metástasis (M)	
M0	No metástasis distante
M1	Metástasis distante

Tabla 3. Clasificación TNM para cáncer de páncreas de acuerdo a la 7ª edición del Manual de Estadificación del Cáncer del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) [92].

En la práctica clínica es de gran importancia evaluar la resecabilidad del tumor para identificar a los pacientes candidatos al tratamiento quirúrgico [5]. Así, los tumores pancreáticos son clasificados como tumores resecables,

potencialmente resecables (*borderline*) e irresecables, de acuerdo al grado de contacto entre el tumor y los vasos principales [17]. En este sentido, los tumores T1 y T2 se consideran resecables, los tumores T3 potencialmente resecables (aunque afectan a la vena mesentérica superior y/o venas porta y esplénica, estas pueden ser resecadas y reconstruidas) y los tumores T4 son irresecables (afectan al tronco celíaco y/o a la arteria mesentérica superior) [92]. En la Tabla 4 se puede observar el criterio de resecabilidad de acuerdo al estadio tumoral para el PDAC.

Estadio*	TNM*	Descripción*†	Media supervivencia global (meses) [#]	
			Con cirugía	Sin cirugía
IA	T1, N0, M0	Resecable	24,1	6,8
IB	T2, N0, M0	Resecable	20,6	6,1
IIA	T3, N0, M0	Potencialmente resecable	15,4	6,2
IIB	T1/T2/T3, N1, M0	Resecable/Potencialmente resecable	12,7	6,7
III	T4, N0/N1, M0	Irresecable	10,6	7,2
IV	Cualquier T, N0/N1, M1	Metástasis distante	4,5	2,5

Tabla 4. Estadificación y TNM en relación a la resecabilidad del tumor pancreático y a la supervivencia global. * Datos obtenidos de la 7ª edición del Manual de Estadificación del Cáncer del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) [92]. † Los tumores T1 y T2 se consideran resecables, T3 potencialmente resecable y T4 irresecables. # Datos obtenidos de Bilimoria y cols. [93].

3.6. Tratamiento

3.6.1. Tratamiento quirúrgico

Actualmente, la resección quirúrgica es la única opción de tratamiento curativa en pacientes con PDAC localizado [94]. En relación a este tratamiento, el riesgo de muerte se sitúa alrededor del 2%, siendo las cifras de morbilidad mucho más elevadas (60%) [95]. Estos datos se asocian con las capacidades del Centro Hospitalario, ya que las tasas de mortalidad y morbilidad son menores en centros especializados [96] que cuentan con equipos médicos más

experimentados, recomendándose aquellos que realicen más de 15 resecciones pancreáticas al año [97].

Dado que en la mayoría de los casos el tumor se diagnostica en fases avanzadas, solo el 20% de los pacientes diagnosticados pueden beneficiarse de la cirugía curativa [63]. De hecho, se ha visto que la resección no mejora la supervivencia de pacientes con cáncer localmente avanzado o metastásico [98, 99], aunque, como veremos en apartados posteriores (ver apartado 3.6.5. Tratamientos paliativos y de soporte), en ocasiones se realiza cirugía paliativa, con el objetivo de disminuir los síntomas que acontecen en tumores en fases más avanzadas.

Siguiendo los criterios de resecabilidad expuestos previamente (Tabla 4), el tipo de cirugía viene determinado por la localización del tumor [85]. De este modo, la pancreaticoduodenectomía (o procedimiento de Whipple) es la cirugía de elección ante tumores localizados en la cabeza del páncreas. Sin embargo, en esta intervención existe un elevado riesgo de complicaciones postquirúrgicas [100]. Los tumores resecables del cuerpo o la cola, generalmente se encuentran más avanzados que los localizados en la cabeza del páncreas [101], por lo que el tratamiento quirúrgico para estos se basa en la pancreatectomía (distal o, a veces, total), generalmente acompañada de esplenectomía, procedimientos que también suelen presentar complicaciones postoperatorias en gran parte de los pacientes (alrededor del 35%) [102]. Actualmente, algunos pacientes con tumores tempranos pueden beneficiarse del tratamiento quirúrgico mediante técnicas mínimamente invasivas, como la laparoscopia, que produce menos efectos secundarios [101].

3.6.2. Tratamiento quimioterápico

El tipo de quimioterapia (QT) empleado en el tratamiento del PDAC depende del objetivo terapéutico perseguido [16]. Este tipo de terapia está indicado en todos los casos de PDAC, independientemente de que haya sido o no posible la resección quirúrgica del tumor. Tan sólo en aquellos casos metastásicos con mal estado general (*performance status* o PS 3/4), edad

avanzada y corta esperanza de vida, se considera el tratamiento de soporte (15-20% de los casos) [17, 103].

Tras varias décadas empleando el 5-fluorouracilo (5FU) como tratamiento principal en la terapia de PDAC [104], actualmente la gemcitabina (GEM) constituye el tratamiento estándar para esta enfermedad, ya que ha mostrado mejores resultados que el 5FU en términos de supervivencia (tasa a 1 año en PDAC avanzado 18% y 2% para GEM y 5FU, respectivamente) [105]. No obstante, existen otros fármacos que también son utilizados para el tratamiento de PDAC en monoterapia o combinados (Tabla 5).

Fármacos aprobados para el tratamiento de adenocarcinoma ductal pancreático	
•Fluorouracilo (Adrucil®)	•Capecitabina (Xeloda®)
•Gemcitabina (Gemzar®)	•Cisplatino (Platinol®)
•Erlotinib (Tarceva®)	•Paclitaxel (Taxol®)
•Irinotecán (Camptosar®)	•Docetaxel (Taxotere®)
•Oxaliplatino (Eloxatin®)	•Irinotecán liposomal (Onivyde®)
•Paclitaxel ligado a albúmina (Abraxane®)	•Mitomicina (Mutamycin®)

Tabla 5. Fármacos aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de adenocarcinoma ductal pancreático. Modificado de *American Cancer Society: Pancreatic cancer* [5].

Aunque la resección tumoral sea el tratamiento más eficaz ante un caso de PDAC, la tasa de recidiva tras la cirugía es elevada, produciéndose el 80% de ellas en los 2 primeros años tras la operación [103]. Según varios estudios clínicos, la QT adyuvante ha conseguido mejorar el pronóstico de estos pacientes, proporcionando ventajas respecto a aquellos solo sometidos a tratamiento quirúrgico, en relación a diferentes aspectos clínicos (desarrollo de recurrencia, supervivencia libre de enfermedad, etc.) [106-110]. Estos datos ponen de manifiesto la importancia que tiene la QT adyuvante en pacientes con enfermedad localizada (resecable), y en los que el tratamiento suele consistir

en GEM o 5FU+leucovorín [17]. Ambos regímenes terapéuticos adyuvantes no muestran diferencias significativas respecto a la supervivencia global en PDAC completamente resecado [111].

Menos de un 5% de los casos de PDAC son tumores *borderline* o al límite de la resección (antes considerados como irresecables) [103]. Aunque estos tumores también son sometidos a regímenes de tratamiento adyuvante, la terapia neoadyuvante es de vital importancia en este tipo de pacientes, en un intento de hacer factible la resección tumoral. De hecho, con este tratamiento se consiguen mayores tasas de resección completa (R0) [112]. El tratamiento neoadyuvante recomendado para estos pacientes consiste en QT seguida de quimiorradioterapia (QRT) [17] aunque, como veremos en apartados posteriores (ver apartado 3.6.4 Quimiorradioterapia), la ventaja que supone el empleo de quimiorradiación es un tema muy discutido. Por todo esto, si existe la posibilidad, es muy recomendable la inclusión de los pacientes con tumores *borderline* en ensayos clínicos [100].

Respecto al tratamiento de tumores no resecables (localmente avanzados o metastásicos), la primera línea de tratamiento consiste en GEM [105]. Sin embargo, hay que destacar que la mayoría de los pacientes no responden a dicho tratamiento por la elevada quimiorresistencia [113], con lo que la GEM no muestra un gran impacto en la supervivencia global de estos pacientes [114, 115]. Por este motivo, se han realizado varios estudios combinando GEM con otros agentes como capecitabina [116], oxiplatino [117] y cisplatino [118], sin embargo, los resultados no muestran una mejora significativa en la supervivencia de pacientes con tumores irresecables [119, 120]. Por otro lado, la combinación de GEM+nab-paclitaxel (paclitaxel unido a albúmina) ha conseguido mejorar la supervivencia en pacientes con cáncer avanzado respecto a GEM en monoterapia [121, 122], presentando una toxicidad similar [123]. Además, se ha visto que nab-paclitaxel provoca efectos sinérgicos en combinación con GEM y aumenta los niveles de quimioterápicos en el tumor [121].

Otro tratamiento aprobado para el PDAC avanzado está basado en la combinación de GEM y erlotinib, un inhibidor de la tirosina quinasa asociada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), capaz de inhibir la proliferación celular a muy bajas concentraciones [124]. La estimulación de este receptor conduce a la activación de distintas e importantes vías de señalización, como la ruta de las MAPK y la vía PI3K/AKT, promoviendo el crecimiento y la supervivencia celular [124]. La mayoría de los pacientes con PDAC presentan sobreexpresión del EGFR [125, 126], lo que se ha asociado con mal pronóstico y progresión de la enfermedad en este tipo tumoral [127]. En este sentido, la adición de erlotinib al tratamiento con GEM ha conseguido una cierta mejora en la supervivencia de los pacientes con PDAC localmente avanzado o metastático, respecto al uso de GEM en monoterapia [128]. No obstante, hay que reseñar que la combinación de GEM con inhibidores del EGFR no ha resultado en beneficios de supervivencia significativos para los pacientes en todos los estudios realizados en PDAC [129]. Por otra parte, es importante destacar que la actividad del EGFR es esencial para la función fisiológica normal de la epidermis y, por tanto, su inhibición suele causar efectos adversos cutáneos. De este modo, la aparición de erupciones en la piel, también llamada rash (SR), es el efecto secundario más común de erlotinib [130]. En este contexto, varios estudios con distintos tipos tumorales, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, de cabeza y cuello, de páncreas y de ovario, han asociado el desarrollo de SR en pacientes a mejores resultados clínicos [131, 132], de forma que, de manera general, la aparición de SR se considera un marcador subrogado potencial de respuesta a esta terapia [133, 134].

Otro régimen quimioterápico que combina distintos agentes, pero sin suministrar GEM al paciente, es FOLFIRINOX (oxaliplatino, irinotecán, 5FU y leucovorín), que ha conseguido mejoras en la supervivencia global y supervivencia libre de progresión en pacientes metastásicos respecto a GEM (11.1 vs 6.8 meses y 6.4 vs 3.4 meses, respectivamente). Desafortunadamente, FOLFIRINOX provoca un cuadro de efectos secundarios importante, por lo que su uso en pacientes es limitado [135]. Así, según las guías de la Sociedad Europea para Oncología Médica (ESMO), para pacientes

con enfermedad localmente avanzada, el tratamiento adyuvante estándar se basa en GEM durante 6 meses [17], mientras que para los casos metastásicos existen ciertas consideraciones: la quimioterapia para pacientes con PS 2 puede consistir en GEM en monoterapia o GEM combinada con nab-paclitaxel (este último tratamiento también puede considerarse en pacientes con PS 0 o 1), reservándose el uso de FOLFIRINOX para pacientes con PS 0 o 1 [17]. Recientemente, se ha aprobado el uso de irinotecán junto con 5FU y leucovorín para tratar pacientes con PDAC metastásico que hayan sido previamente tratados con GEM, dadas las mejoras en la supervivencia observadas en el estudio NAPOLI-1 (supervivencia media de 6,1 meses y 4,2 meses con irinotecán/5FU/leucovorín y 5FU/leucovorín, respectivamente) [136].

3.6.3. Tratamiento radioterápico

En general, los pacientes con PDAC pueden recibir dos tipos diferentes de radiación, externa o interna. La radiación externa (EBRT), se aplica desde fuera del cuerpo y se centra en la localización del tumor. Existen distintos tipos de EBRT para PDAC, incluyendo radioterapia conformacional tridimensional (3D-CRT), radioterapia de intensidad modulada (IMRT) y radioterapia estereotáctica ablativa (SABR). Por otro lado, la radiación interna, también llamada braquiterapia, se aplica desde el interior del cuerpo durante la cirugía, implantando una fuente radiactiva lo más cerca posible del tumor [137].

La ventaja que este tipo de tratamiento podría suponer para los pacientes con PDAC es un tema que suscita controversia debido a la discrepancia en los resultados obtenidos [138]. Algunos autores sugieren que la radioterapia (RT), podría aportar beneficios a los pacientes con PDAC, especialmente cuando nos encontramos ante tumores *borderline*, en los que la RT neoadyuvante podría conseguir que tumores previamente clasificados como irresecables lleguen a ser resecables tras el tratamiento [16, 138]. Además, en el contexto adyuvante, la RT podría ayudar al control local del tumor una vez realizada la cirugía [139]. Por otro lado, alrededor de un 33% de los pacientes sometidos a pancreatometomía no pueden recibir terapia adyuvante por distintos motivos (como elevada morbilidad, diseminación temprana, etc.), con lo que la

optimización de la RT como tratamiento neoadyuvante podría aportar beneficios a estos pacientes [138].

En general, cuando se hace uso de la RT para el tratamiento del PDAC, esta se combina con QT en un intento de potenciar el efecto antitumoral [137].

3.6.4. Quimiorradioterapia

Dado que la QRT implica el uso de QT junto con terapia de radiación, el uso de este tratamiento también ha sido objeto de debate en el contexto del PDAC [140]. Una de las ventajas expuestas entorno al uso de la QRT neoadyuvante es su potencial para excluir de la resección quirúrgica a aquellos pacientes con progresión en desarrollo, evitándoles así una cirugía innecesaria, la cual, muy probablemente, no les aportaría beneficios y sí numerosas complicaciones [141]. Sin embargo, el hecho de realizar un tratamiento de QRT neoadyuvante se traduce en una resección más tardía, lo cual podría aumentar el riesgo de progresión tumoral [142].

Algunos de los resultados disponibles actualmente indican que la QRT neoadyuvante podría ser beneficiosa en el tratamiento, principalmente en tumores *borderline*, donde ha conseguido aumentar tanto la supervivencia como las tasas de resecciones completas (R0) en tumores inicialmente irresecables [112, 143-146]. Sin embargo, otros resultados obtenidos sugieren que este tratamiento neoadyuvante no proporciona mejoras significativas en la supervivencia global [142].

La QRT como tratamiento adyuvante también ha mostrado resultados positivos sobre la supervivencia global en PDAC [147-149], incluso en pacientes con tumores irresecables [150], aunque las conclusiones en este último caso se consideran poco fiables por la metodología seguida y su limitado poder estadístico [151]. Sin embargo, otras investigaciones determinan que la QRT adyuvante no aporta beneficios significativos en la supervivencia de estos pacientes [110, 142, 152-154], e incluso que podría tener efectos negativos sobre la misma [106].

De acuerdo a la guía de la ESMO, no se recomienda, de manera genérica, el tratamiento mediante QRT para tumores localizados, excepto en ensayos clínicos. Sin embargo, su uso tras un periodo de QT antes de la cirugía se considera la mejor opción en pacientes con tumores *borderline*. Respecto a los tumores localmente avanzados, la QRT basada en capecitabina es la más recomendada [17].

3.6.5. Tratamientos paliativos y de soporte

Los pacientes con tumores en fases más avanzadas (localmente avanzados y metastásicos) deben recibir tratamiento de soporte para intentar controlar los síntomas de la enfermedad, independientemente de que estos pacientes sean o no candidatos a tratamiento con QT. En este sentido, las cifras muestran que el 15-20% de los pacientes con PDAC avanzado solo pueden recibir tratamiento de soporte [103].

Cuando no es posible la resección tumoral, puede realizarse una cirugía paliativa en los casos avanzados, con el objetivo de controlar algunos de los síntomas de la enfermedad [5]. Entre los principales síntomas que sufren estos pacientes se encuentran la ictericia obstructiva y la obstrucción duodenal, que pueden abordarse mediante intervenciones quirúrgicas y endoscópicas [11], siendo estas últimas las mejor consideradas [17]. El dolor es otro de los síntomas más importantes, pudiendo tratarse con métodos analgésicos clásicos o con técnicas quirúrgicas, no quirúrgicas o RT [77].

La QT paliativa puede mejorar ligeramente la supervivencia en pacientes no candidatos a cirugía, al igual que las terapias ablativas [77], aunque estas últimas no suelen emplearse en tumores del páncreas exocrino como es el caso del PDAC [5]. El tratamiento basado en GEM es la QT paliativa más común, ya que prolonga la supervivencia y mejora la calidad de vida de los pacientes [105, 155]. Como mencionamos anteriormente (ver apartado 3.6.2. Tratamiento quimioterápico), otros de los tratamientos considerados para el PDAC avanzado o metastásico son la combinación de GEM con erlotinib [156] o nab-paclitaxel y el uso de FOLFIRINOX [17].

3.7. Lesiones precursoras

Los resultados derivados de estudios histológicos y genéticos realizados en PDAC sugieren que esta patología puede originarse a partir de distintas lesiones precursoras, cuya progresión ocurre a lo largo de una media de 17 años [10] y que se han denominado neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN), neoplasia quística mucinosa (MCN) y neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) [10, 25]. La mayoría de los PDAC se originan a partir del primer tipo [11]. Los eventos descritos [157, 158] han permitido desarrollar un modelo génico multipaso, similar al establecido para carcinoma colorrectal [159], que explica cómo desde un epitelio ductal normal del páncreas y tras el acúmulo de mutaciones paralelas a la transformación histológica, se originan lesiones precursoras que terminan en un carcinoma invasivo (Figura 2) [160, 161].

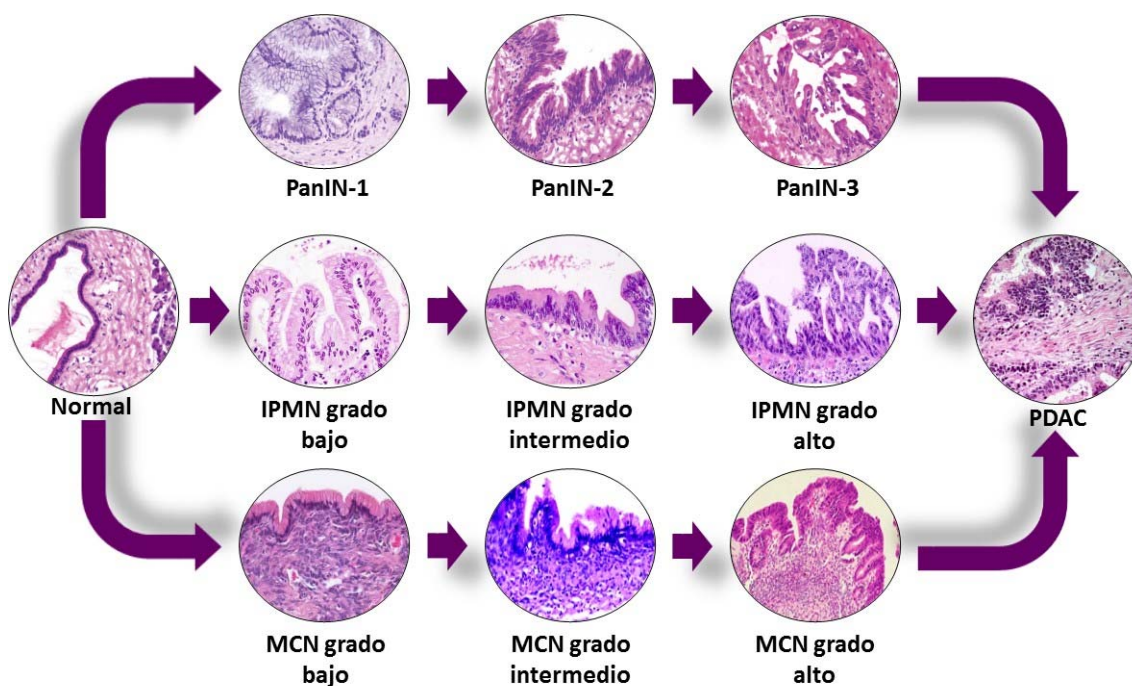


Figura 2. Modelo de progresión desde tejido pancreático normal hasta adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) a partir de lesiones precursoras. Imágenes obtenidas de Matthaei y cols. [162], Castellano-Megías y cols. [163], Fritz y cols. [164], Volkan Adsay NV [165].

Clásicamente, el sistema de clasificación para cada una de estas lesiones se basaba en el establecimiento de tres categorías de acuerdo a su histología (bajo, medio y alto), de modo que estas se establecían en base a los grados de atipia arquitectónica y citológica observados en la lesión. Sin embargo, en el año 2015, se ha revisado este esquema de clasificación y se ha sugerido que un sistema que establezca sólo dos niveles para cada una de las lesiones, igualmente basado en la histología de la lesión, es más apropiado en la rutina clínica [166].

3.7.1. Lesiones precursoras quísticas microscópicas

Las PanINs constituyen las lesiones precancerígenas más frecuentes y estudiadas en PDAC. Son proliferaciones epiteliales microscópicas y no invasivas en los conductos pancreáticos [11, 167] de pequeño calibre, que normalmente se localizan en la cabeza del páncreas [168]. Presentan distintos grados de atipia citológica y estructural [11], lo que ha permitido clasificarlas en lesiones de bajo grado (PanIN1), lesiones de grado intermedio (PanIN2) y lesiones de alto grado (PanIN3) [25, 168], siendo estas últimas las que preceden al carcinoma *in situ*. Como comentamos anteriormente, este sistema se ha modificado, distinguiendo en la actualidad entre PanINs de bajo (PanINs1 y PanINs2) y alto grado (las PanINs3). Son estas últimas las que entrañan un riesgo más elevado de originar un carcinoma invasivo [166], denominándose en muchas ocasiones carcinoma *in situ* [15].

A medida que estas lesiones progresan en su desarrollo, aumentan su tasa de proliferación celular [169], el grado de displasia y su complejidad, presentando mayor atipia nuclear y una arquitectura más desorganizada [170], todo ello acompañado de una serie de alteraciones genéticas, hasta la formación de un carcinoma invasivo [68]. Este modelo de progresión multipaso desde PanINs a PDAC se conoce como PanINgram [171] (Figura 3). Es común encontrar PanINs de bajo grado en tejido pancreático no tumoral, especialmente en personas de mayor edad o con pancreatitis crónica [15] y PanINs3 en tejido pancreático de personas con predisposición familiar a PDAC o con adenocarcinoma establecido [15, 68]. A pesar del potencial de estas lesiones para la transformación maligna, la identificación de PanINs en

márgenes de resección R0 en pacientes con PDAC, no se correlaciona con la supervivencia, independientemente de su grado de displasia [172].

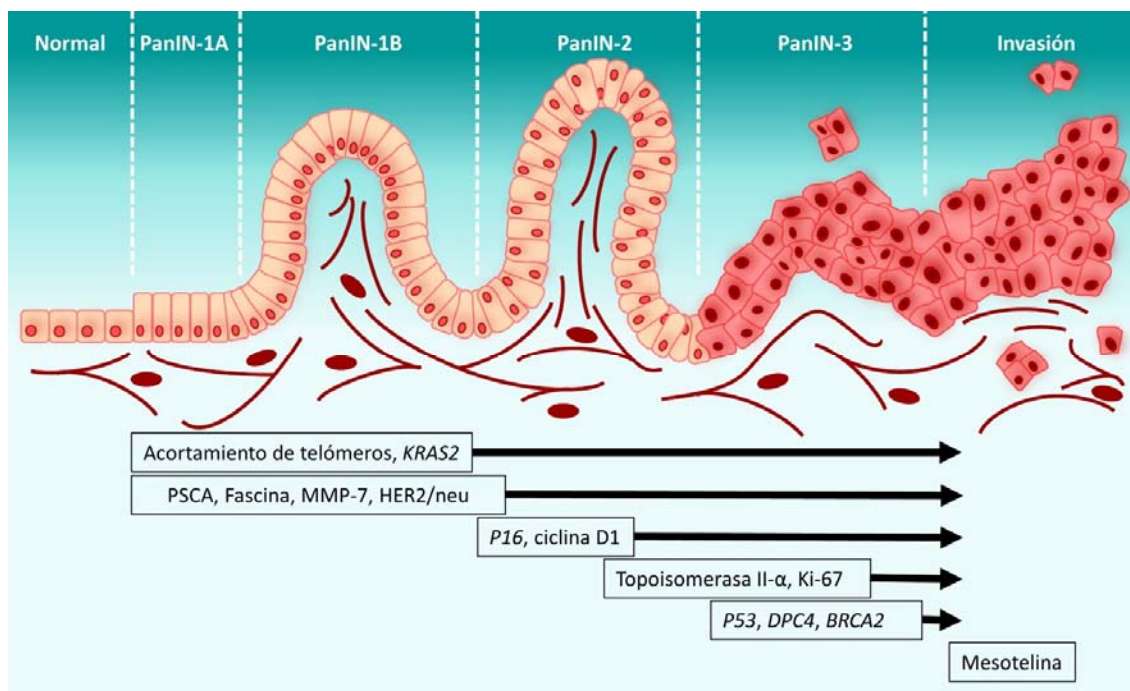


Figura 3. Modelo de desarrollo desde PanINs hasta adenocarcinoma ductal pancreático invasivo. Modificado de Maitra y cols. [171].

3.7.2. Lesiones precursoras quísticas macroscópicas

Estas lesiones precursoras son menos comunes que las anteriores, presentan mayor tamaño [170] y también, siguiendo la modificación del esquema de clasificación (2015), se han categorizado en bajo grado y alto grado de displasia, siendo estas últimas las lesiones con implicaciones clínicas importantes [166].

3.7.2.1. Neoplasia mucinosa papilar intraductal

A nivel celular, las IPMNs se asemejan a las PanINs, pero las primeras forman quistes mucinosos de mayor tamaño (> 1 cm) [170, 173]. Se originan en el sistema de conductos del páncreas, normalmente a partir del conducto principal o de conductos secundarios de gran calibre [170], siendo las primeras las de mayor potencial maligno [68] (riesgo de desarrollar carcinoma invasivo

en un plazo de dos años a partir de IPMNs del conducto principal o de sus ramificaciones 58% y 9%, respectivamente) [174].

La mayoría de las IPMNs (> 80%) se desarrollan en la cabeza del páncreas [175] y en personas con mas de 70 años [68]. Se pueden encontrar IPMNs de bajo y alto grado [166] de displasia, existiendo una secuencia acumulativa de mutaciones a medida que aumenta el grado de la lesión [25]. Aunque estas neoplasias crecen lentamente, en el momento de la resección, alrededor de un tercio de ellas están asociadas a un adenocarcinoma invasivo [11, 25].

3.7.2.2. Neoplasia quística mucinosa

Las MCNs son menos comunes que las anteriores, teniendo lugar mayoritariamente en mujeres [11, 175]. Son grandes lesiones productoras de mucina que no están conectadas con los conductos pancreáticos [11]. Normalmente se localizan en el cuerpo y la cola del páncreas, siendo una de sus principales características la presencia de un estroma de tipo ovárico subyacente [11, 170]. Al igual que en el caso anterior, se clasifican en lesiones de bajo y alto grado [166], presentan acúmulo de mutaciones y en el momento de la resección suelen presentar un carcinoma invasivo asociado [11].

3.7.3. Alteraciones génicas en lesiones precursoras

Durante los últimos años se han realizado numerosos análisis genéticos que han aportado un gran conocimiento sobre distintas alteraciones génicas que subyacen en el desarrollo de PDAC [11]. Esto ha permitido la identificación de distintas vías alteradas en la carcinogénesis pancreática [170] (Figura 4). En este sentido, un estudio basado en 100 tejidos con PDAC, reveló un total de 11.868 variantes somáticas (media de 119 por paciente) en la estructura cromosómica, incluyendo deleciones, duplicaciones, duplicaciones en tándem, inversiones, etc. [176]. Muchas de las alteraciones encontradas en PDAC, como mutaciones, modificaciones epigenéticas o cambios de expresión a nivel de ARN y proteínas [177], se han identificado también en lesiones precursoras, con una frecuencia creciente paralela al progreso de la lesión. Este hecho, apoya el modelo multipaso de la carcinogénesis pancreática, el cuál ha sido

más ampliamente caracterizado en las PanINs (modelo PanINgram) [171] que en las IPMNs y MCNs [157].



Figura 4. Rutas de señalización y procesos celulares alterados en adenocarcinoma ductal pancreático. Modificado de Samuel y Hudson [178].

Entre las alteraciones moleculares que se han detectado en las lesiones precursoras de PDAC, podemos destacar las siguientes:

Oncogenes

Una de las alteraciones genéticas más tempranas que se ha observado en el desarrollo de PDAC son las mutaciones que activan el oncogen *KRAS2* [157], implicado en las cascadas de señalización *RAF/MAPK*, *PI3K/AKT* y *Ra-GDS*. Estas mutaciones inducen alteraciones en los procesos de proliferación,

diferenciación y la supervivencia celular [177] y tienen lugar en casi el 100% de los PDAC avanzados [179] y con alta frecuencia en lesiones PanINs, IPMNs y MCNs [180-182]. Mutaciones de *KRAS2* han sido detectadas en lesiones PanINs1A (36%), PanINs1B (44%) y PanINs2 y PanINs3 (87%) [183] y también en lesiones IPMNs (40-65%) [184], principalmente en el subtipo pancreatobiliar [185], y en MCNs de bajo, medio y alto grado (20%, 33% y 89%, respectivamente) [186]. Este hecho refleja la importancia de estas mutaciones en los primeros pasos de la carcinogénesis del páncreas [157].

Además, se ha observado alteración de otros oncogenes en lesiones precursoras, como *PI3K*, que aparece mutado en el 10-20% de las IPMNs de tipo intestinal aunque no en PDAC [187, 188]. Mutaciones que activan el gen *GNAS* y que parecen conducir a una mayor proliferación celular por la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) continuada [189], aparecen en algunos tipos de lesiones precursoras, siendo específicas de IPMNs (66%) [184] principalmente en el subtipo intestinal [177, 185] y no apareciendo en MCNs ni PanINs [190].

Genes supresores de tumores

Las mutaciones que inactivan genes supresores de tumores constituyen otro de los eventos genéticos más estudiados en el desarrollo de PDAC. Por ejemplo, la inactivación del gen *CDKN2/P16*, implicado en el control del ciclo celular, impide la entrada en la fase S del ciclo conduciendo a una proliferación celular continuada [170, 191]. Aproximadamente el 95% de los pacientes con PDAC presentan inactivación de *CDKN2* [192], al igual que el 30% de las lesiones PanINs1, 55% de PanINs2 y 71% de PanINs3, constituyendo una de las alteraciones genéticas más tempranas en el desarrollo de PDAC [191, 192]. Además, se ha detectado alteración de la expresión de *CDKN2A/P16* en IPMNs [177] y MCNs [180]. Sin embargo, la pérdida de *CDKN2A/P16* se ha catalogado como un evento tardío en el desarrollo de lesiones IPMNs [193], observándose principalmente en IPMNs de alto grado [180] y aumentando su frecuencia al aumentar el grado de displasia [194].

Los genes supresores de tumores *TP53* y *SMAD4* parecen alterarse de forma tardía en la carcinogénesis pancreática [180, 181, 185, 195]. *TP53* actúa activando la transcripción de genes implicados en la reparación del ADN, ciclo celular y apoptosis [196], de forma que su inactivación aumenta la inestabilidad genómica, permitiendo la proliferación y supervivencia de células con daños en el ADN [157, 170]. Esta ha sido observada en las fases más avanzadas de la enfermedad [177, 180, 181, 192, 197] y en el 75% de los PDAC [191, 192]. La alteración de *SMAD4*, que interviene en la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), impide la inhibición del crecimiento mediante este factor y conduce a la proliferación de las células tumorales pancreáticas [170]. En general, las lesiones PanINs1 y PanINs2 muestran una expresión normal de este gen, observándose su inactivación en PanINs3 (30%) [198, 199] y PDAC (55%) [180]. Las lesiones IPMNs también presentan falta de expresión de *SMAD4*, aunque esta no es tan frecuente como en las PanINs de alto grado [177], además, dicha expresión no se encuentra alterada en algunos tipos de IPMNs, como el intestinal [199]. Las MCNs avanzadas también muestran inactivación de *SMAD4* [181, 200]. Curiosamente, esta inactivación no se detecta en el estroma tipo ovárico adyacente, incluso en lesiones MCNs de alto grado, lo que sugiere que las células de este estroma adyacente no presentan características neoplásicas [180, 181]. La expresión de este gen se ha asociado con una mayor supervivencia en pacientes con PDAC sometidos a resección quirúrgica [201], y su inactivación con enfermedad más agresiva [202]. Por último, el gen *LKB1/STK11* [177, 203] se ha observado mutado en el 25% de IPMNs [177, 204].

Reparación del ADN

Algunos genes implicados en el mantenimiento de la estabilidad genómica, cuya inactivación promueve la progresión maligna [169], también se han relacionado con PDAC. Uno de estos genes es *BRCA2*, aunque su mutación se ha relacionado con el PDAC familiar. Las mutaciones germinales en *BRCA2*, asociadas con riesgo de cáncer de mama y de ovario familiar, también se relacionan con riesgo incrementado de desarrollar PDAC [180], pudiendo estar acompañadas de mutaciones somáticas [177]. La alteración de

BRCA2 se ha observado en PDAC familiar [205] y en lesiones PanINs avanzadas (PanIN3) [206], con lo que la inactivación de *BRCA2* parece ser un evento tardío en el desarrollo de la enfermedad [180]. Mutaciones en *BRCA1* también se han asociado con riesgo de PDAC [179]. Además, se han descrito mutaciones somáticas en genes implicados en la reparación del ADN, incluyendo *BRCA1* y *BRCA2*, en casos de PDAC esporádico [176, 207].

Acortamiento telomérico

El acortamiento de los telómeros, estructura protectora que proporciona estabilidad cromosómica en la división celular, es otra de las alteraciones que tienen lugar en el desarrollo de PDAC. Este acortamiento representa una de los eventos más tempranos en el modelo de progresión del PDAC a partir de lesiones precursoras, aumentando a medida que la lesión progresa [177]. Se ha encontrado acortamiento telomérico en el 90% de las lesiones PanINs de menor grado [208] y en el 50% de las IPMNs de bajo grado [209].

Alteraciones transcriptómicas

Las alteraciones transcriptómicas pueden dar lugar a sobreexpresión en genes como *PSCA*, miembros de la familia *EGF* y *MMP-7*, en fases tempranas del modelo de desarrollo del PDAC [180]. La proteína *PSCA*, que no se encuentra en tejido pancreático no tumoral, se ha detectado en PanINs1, panINs2 y panINs3 [171] y en el epitelio de MCNs [210]. Algunos miembros de la familia *EGF*, como los receptores EGFR y HER2, implicados en la proliferación celular, están sobreexpresados en lesiones precursoras tempranas y avanzadas y en PDAC [169, 211-215]. Concretamente, la sobreexpresión de HER2 se ha observado en PanINs1, PanINs3 [212, 213] e IPMNs [199] (50-82%, 80-95% y 75%, respectivamente). La sobreexpresión de *MMP-7*, importante en la proteólisis de la superficie celular [216], se ha detectado en PanINs1 y en la mayoría de los PDAC, pero no en tejido pancreático normal [217].

La sobreexpresión de ciclina D1, un esencial regulador del ciclo celular [180], se ha descrito como evento intermedio en el modelo de progresión del PDAC, detectándose en PanINs2, PanINs3 y PDAC y no en lesiones más

tempranas [171]. Por otra parte, la sobreexpresión de mesotelina, implicada en la adhesión celular, se ha detectado en PanINs1, 2 y 3 y en el 100% de PDAC [180, 171, 218] mientras que Topo II alfa y Ki-67 no muestran una expresión significativa en las lesiones más tempranas, detectándose tan solo en PanINs2 y 3 [171]. Además, durante el desarrollo de las IPMNs, también se ha observado sobreexpresión de algunos marcadores de proliferación, incluyendo Ki-67 [219].

Otras alteraciones transcriptómicas detectadas en lesiones precursoras incluyen alteraciones en la expresión de ciertos miembros de la familia de las claudinas. Por ejemplo, la expresión de claudina 18 se incrementa durante el desarrollo de las lesiones precursoras y se considera una alteración temprana en el desarrollo tumoral [220]. Por otro lado, la claudina 2 presenta un patrón transcritómico basado en una disminución de la expresión a medida que aumenta el grado de displasia [221]. Algunas mucinas (MUC) también se encuentran alteradas, por ejemplo, la expresión de MUC1 es común en tejido pancreático normal, aunque también se ha asociado con MCNs de alto grado y con PDAC. Por el contrario, MUC2, que se expresa comúnmente en IPMNs y MCNs de bajo grado, no se expresa en tejido pancreático normal, PDAC ni en PanINs [171, 177]. Además, en MCNs e IPMNs [192] se observa la sobreexpresión de MUC5AC, y por su parte, MUC6 sigue un mismo patrón en PanINs, IPMNs y MCNs, expresándose en fase temprana [177, 192].

Dadas las características epiteliales de las MCNs, existen diferentes alteraciones transcriptómicas según se trate del epitelio o del estroma ovárico. Mientras existe sobreexpresión epitelial de los genes *S100P*, *MYC*, *catepsina E* y *MET* [177], el estroma ovárico sobreexpresa genes relacionados con el metabolismo de estrógenos como *STAR* y *SR1* [210].

4. Nuevos biomarcadores diagnósticos en cáncer: perfil de expresión génica

La tecnología de microarrays es una metodología de alto rendimiento que permite estudiar determinadas características de una muestra biológica, proporcionando desde miles a millones de datos cuantitativos y/o cualitativos de manera simultánea [222]. El desarrollo de esta tecnología, junto con la publicación de los resultados del Proyecto Genoma Humano en el año 2001 [223, 224] y los avances bioinformáticos, suponen una poderosa herramienta en el campo de la investigación del cáncer [225, 226]. Un array consiste en una matriz en la que se anclan sondas en las que hibridan, por homología, los ácidos nucleicos. Dependiendo del tipo de sondas así será su aplicación, existiendo microarrays basados en proteínas, para estudios de microARNs, metilación del ADN, etc. [227]. No obstante, nos centraremos en los microarrays de expresión génica, dado que son los que nos ocupan en este trabajo.

4.1. Microarrays de expresión génica

Los microarrays de expresión permiten estudiar, en una muestra biológica determinada, la expresión de miles de genes simultáneamente. Los microarrays de expresión génica se basan en la hibridación, o unión específica, de un fragmento de ácido nucleico monocatenario derivado de la muestra a estudiar (denominado diana o *target*) a una sonda (también denominada *probe* o *reporter*), que posee la secuencia complementaria al ARNm transcrito por un gen determinado. En un microarray se incluyen millones de sondas, las cuales representan a miles de genes, adheridas a una superficie, de modo que la mezcla de ADNc o ARNc marcado derivada de la muestra de interés, hibrida con las sondas del microarray. Posteriormente, se cuantifica la señal emitida, que representa la abundancia de transcrito presente en la muestra problema [228]. En general, de acuerdo a la longitud de las sondas presentes en el microarray, podemos distinguir microarrays de ADNc y microarrays de oligonucleótidos [229], ambos tipos difieren respecto a la fabricación y protocolo experimental (Figura 5).

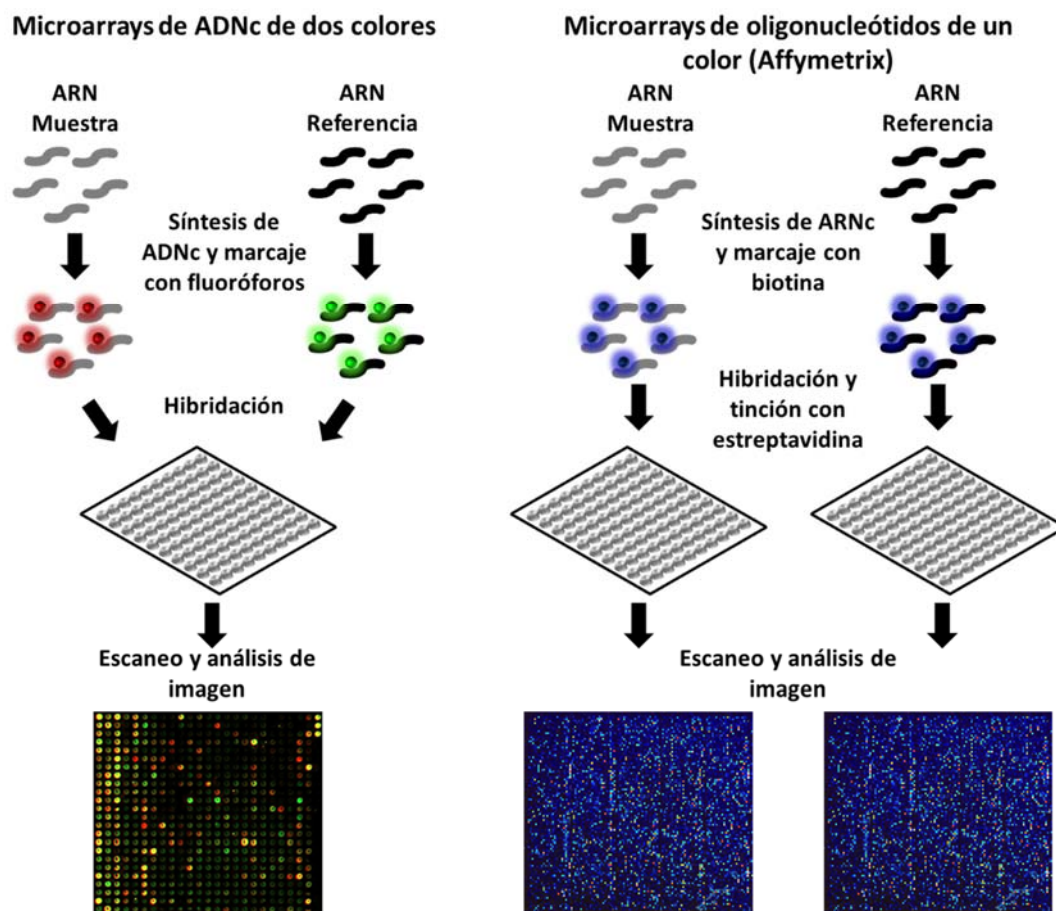


Figura 5. Esquema de hibridación de muestras en microarrays.

Los microarrays de ADNc incluyen sondas de mayor longitud que los de oligonucleótidos, constituidas por más de 100 pares de bases (pb), las cuales son sintetizadas y posteriormente adheridas a la superficie del microarray [229, 230]. Esta aproximación permite hibridar la muestra de interés y la de referencia en un mismo microarray, dado que el ADNc derivado de cada una de ellas puede marcarse con fluoróforos diferentes, proporcionando una imagen bicolor [231, 232]. De esta forma, tras la hibridación y el análisis, podemos estimar la cantidad de transcritos de la muestra problema en relación a la muestra de referencia [233].

Por el contrario, los microarrays de oligonucleótidos están constituidos, generalmente, por sondas cortas, normalmente entre 25-80 pb [230, 234], las cuales se sintetizan *in situ* [235] mediante distintas tecnologías, por ejemplo

fotolitografía, [229, 236], empleada en los chips de Affymetrix (Santa Clara, CA) [227, 229, 237]. En este caso, el ADNc obtenido de la muestra de interés se retrotranscribe a ARNc, con nucleótidos marcados. El marcaje suele realizarse con fluoróforos o con biotina, siendo este último el empleado por Affymetrix. Tras la hibridación se analiza la fluorescencia, aunque en el caso de los chips de Affymetrix existe un paso previo de tinción con estreptavidina conjugada con un fluoróforo [237], obteniéndose una imagen monocolor, donde la señal detectada representa la cantidad absoluta de cada transcrito [238].

El uso de microarrays de oligonucleótidos se ha generalizado como alternativa a los microarrays de ADNc, dado que ofrecen ciertas ventajas como la mayor facilidad de diseño y especificidad [239], minimizando las hibridaciones cruzadas. Aunque existen numerosas compañías dedicadas a la fabricación de microarrays de oligonucleótidos, como Agilent Technologies (Palo Alto, CA) o Roche NimbleGen (Madison, WI), la plataforma GeneChips de Affymetrix (Santa Clara, CA) es la más conocida y empleada [222]. No obstante, la evolución en este campo ha permitido el desarrollo de otras aproximaciones, como por ejemplo los BeadArrays de Illumina (San Diego, CA), basados en oligonucleótidos largos unidos a microesferas [240]. A pesar de la amplia variedad de microarrays de expresión disponibles, todos comparten las mismas bases públicas para la publicación de la información obtenida [241], como Gene Expression Omnibus (GEO) [242, 243] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), ArrayExpress [244] (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), y CIBEX [245] (<http://cibex.nig.ac.jp/>), todos ellos repositorios recomendados por la Sociedad de datos de Expresión Génica de Microarrays (MGED) [241, 246].

4.1.1. Validación de los resultados obtenidos mediante microarrays

Dado el auge adquirido por la tecnología de microarrays, existen numerosas plataformas tecnológicas dedicadas a su fabricación, lo que conlleva una gran variabilidad en los procedimientos técnicos [247]. Además, dado el elevado número de genes analizados, el uso de microarrays para el estudio de las diferencias de expresión génica puede llevar a la obtención de falsos positivos [248, 249]. Para solventar este problema, es necesario el uso

de una tecnología independiente para la validación de los resultados, como el *Northern blot* o la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), siendo esta última la más utilizada tras los experimentos con microarrays [247].

4.1.1.1. PCR cuantitativa a tiempo real

Una vez realizados los estudios de expresión diferencial mediante microarrays, se obtiene una gran cantidad de información sobre miles de genes, de modo que la validación del experimento generalmente se realiza sobre aquellos que son candidatos a estar expresados diferencialmente entre las dos condiciones a comparar [238]. Para llevar a cabo esta validación, la mayoría de los investigadores se decantan por el uso de la qPCR, que permite evaluar aspectos críticos de los microarrays [250] a la vez que presenta varias ventajas, como su elevada sensibilidad en la detección de la señal, especificidad de las secuencias [251], realización fácil y rápida y alta precisión en la cuantificación sobre un amplio rango de concentraciones [252].

La qPCR se basa en la técnica de PCR desarrollada por Mullis y cols., la cual permite la amplificación del ADN presente en una muestra de forma cíclica, generando numerosas copias [253, 254]. La reacción de PCR convencional consta de 3 fases: exponencial, lineal y meseta (Figura 6). En la primera se duplica el producto de la reacción, acumulándose en cada ciclo; en la fase lineal se consumen parte de los reactivos, el producto de reacción no se duplica en cada ciclo y este es muy variable; finalmente se alcanza la fase meseta, en la que se agotan los reactivos y la reacción se detiene [255]. Aunque la PCR convencional cuenta con una serie de ventajas, como su rapidez y sensibilidad, no es una técnica cuantitativa, ya que el amplificado se mide en el punto final de la reacción (en la fase meseta) [255], con lo que la amplificación deja de ser exponencial y la cantidad de producto de reacción no es proporcional a la concentración inicial.

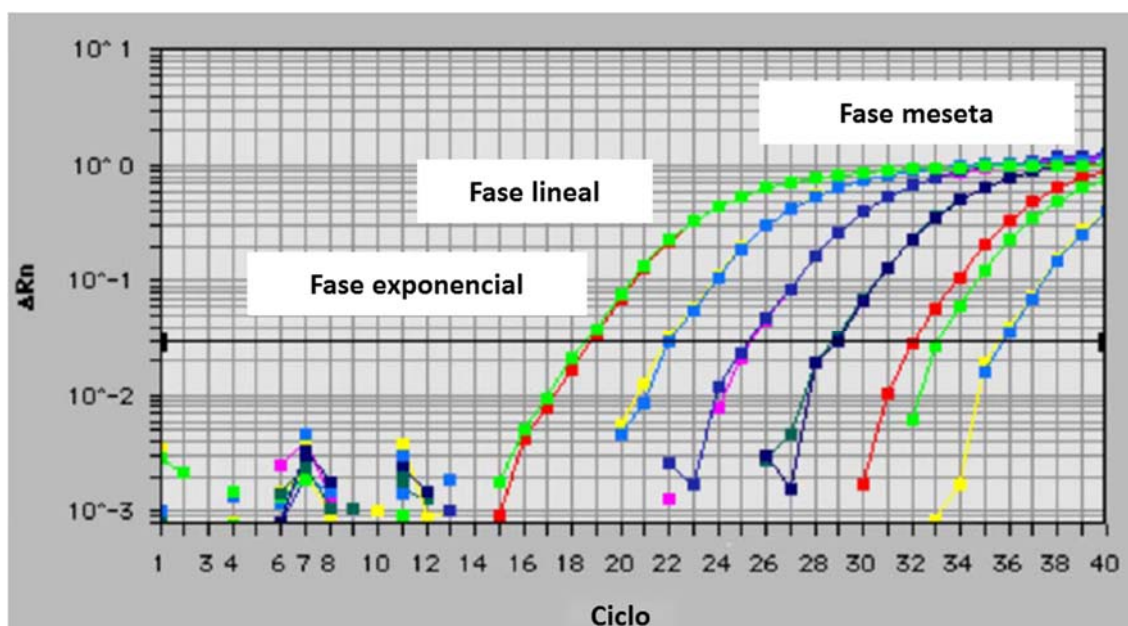


Figura 6. Distribución de las fases exponencial, lineal y de meseta, durante una reacción de PCR con diluciones seriadas de la misma muestra. Modificado de *Applied Biosystems* (<http://www.appliedbiosystems.com>).

Esta importante limitación se superó gracias al desarrollo de la qPCR, que se basa en la amplificación por PCR y la detección del producto originado de manera simultánea [256], de forma que monitoriza, mediante fluorescencia, la cantidad de amplificado durante el curso de la reacción y no al final de la misma. De este modo, la abundancia de producto de PCR presente en cada ciclo de amplificación es proporcional a la intensidad de fluorescencia [257], permitiendo la cuantificación de los niveles de ácido nucleico presentes en una muestra. Los datos se adquieren cuando la intensidad de fluorescencia es mayor que la señal de fondo (*background*), momento conocido como ciclo umbral (Ct) [258].

Entre los sistemas de detección empleados en esta técnica podemos distinguir métodos no específicos (genéricos) y específicos [259]. Dentro de ambos grupos podemos encontrar distintos formatos de detección, sin embargo, nos centraremos en el ejemplo más representativo de cada uno de ellos.

Dentro de los agentes no específicos, el más empleado [252] es SYBR Green® [260], un agente intercalante que se une específicamente al ADN de doble cadena, emitiendo fluorescencia únicamente cuando se produce esta unión. La señal se detecta cuando existe la mayor cantidad de producto de PCR, en los pasos de hibridación o extensión de cada ciclo [261].

Respecto a los métodos específicos, el uso de las sondas de hidrólisis TaqMan® (también denominadas sondas 5' nucleasas) [262] está ampliamente extendido [255]. Son oligonucleótidos que hibridan específicamente con su secuencia diana. Estas sondas están marcadas con dos fluoróforos en los extremos y su acción se basa en la transmisión de fluorescencia entre un donador o *reporter* (marcado con FAM), situado en el extremo 5', y un aceptor o *quencher* (marcado con BHQ), localizado en el extremo 3'. Cuando la sonda está intacta, ambos fluoróforos se encuentran próximos y el aceptor absorbe la fluorescencia del donador, al alejarse por la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa durante la amplificación, el aceptor no puede absorber la fluorescencia del donador y esta es detectada por el sistema [252, 256].

Algunas de las ventajas del empleo de SYBR Green® son su facilidad de uso y menor coste [261], sin embargo, su principal desventaja es la inespecificidad, ya que al unirse a cualquier ADN de doble cadena, parte de la señal detectada puede ser debida a artefactos en la reacción, como la unión a dímeros de *primers* [259]. Esta limitación puede ser superada analizando la curva de disociación o *melting* al final de la reacción de qPCR, lo que permite examinar la presencia de estos artefactos [256]. Por otro lado, las sondas TaqMan® presentan una elevada especificidad, sin embargo el coste económico es mayor [261]. No obstante, para el desarrollo de experimentos de expresión génica ambos métodos se consideran fiables [263].

4.2. Biomarcadores en cáncer

De acuerdo a la definición propuesta por el *Biomarkers Definitions Working Group* del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH), un biomarcador es "cualquier característica medible de forma objetiva y que puede ser evaluada como un indicador de procesos biológicos

normales o patológicos, o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica” [264]. Particularmente, en el campo de la oncología, se define biomarcador tumoral como “cualquier molécula, objetivamente medible, producida por las células tumorales o por el organismo en respuesta al tumor, y que puede ser evaluada como indicador de procesos cancerosos en el cuerpo” [78]. Otra definición alternativa de biomarcador tumoral es la propuesta por Duffy, que lo describe como “cualquier molécula que indica la presencia de un tumor o proporciona información sobre el comportamiento futuro más probable del cáncer” [265].

En general, podemos distinguir varios tipos de biomarcadores tumorales en función de su utilidad clínica (Tabla 6).

Tipo de biomarcador	Utilidad
Evaluación de riesgo	Estiman el riesgo que presenta el paciente de desarrollar cáncer en el futuro
Screening	Permiten la detección de la enfermedad o su grado, la diferencia entre ambos radica en que los <i>de screening</i> implican la detección de la enfermedad en personas asintomáticas, cuando esta se encuentra en fases más tempranas
Diagnóstico	
Pronóstico	Aportan información sobre el curso de la enfermedad, permitiendo guiar las decisiones respecto al tratamiento
Predictivos de respuesta a terapia	Valoración del beneficio que supondrá para el paciente un tratamiento determinado
Farmacodinámico	Evaluación de los efectos que un fármaco provoca en el tumor o el paciente a corto plazo, ayudando en la selección de la dosis
Monitorización	Seguimiento del paciente respecto a la efectividad de la terapia o la progresión de la enfermedad

Tabla 6. Tipos de biomarcadores tumorales de acuerdo a su utilidad.

Independientemente de su utilidad, el biomarcador ideal debe tener una serie de características, como son: elevadas sensibilidad y especificidad, posibilidad de detección precoz, niveles correlacionados con la carga tumoral, vida media corta para permitir mediciones seriadas frecuentes, la prueba empleada para su detección debe ser barata, con el objetivo de su aplicación clínica, y poco invasiva para el paciente [79]. Aunque actualmente existen diferentes biomarcadores con elevadas especificidad y sensibilidad muy útiles en el manejo de pacientes con determinados tipos de cáncer, no existen biomarcadores tumorales con dichas características en la rutina clínica del PDAC [265].

4.2.1. Biomarcadores diagnósticos en adenocarcinoma ductal pancreático

La detección temprana del PDAC es de vital importancia para las opciones de tratamiento para los pacientes, ya que las posibilidades de curación son mucho mayores en fases iniciales de la enfermedad (fases I y II) [25, 266]. Como mencionamos en apartados previos (ver apartado 3.4.2 Análisis de sangre y biomarcadores tumorales), los biomarcadores empleados en clínica para el seguimiento de estos pacientes cuentan con una capacidad diagnóstica limitada. De hecho, en el año 2006, la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) estableció que CA19-9 por sí solo no es recomendable para el diagnóstico de PDAC ni para seleccionar pacientes candidatos a cirugía, ya que no proporciona evidencias definitivas del resultado postoperatorio ni de la recurrencia de la enfermedad [84]. En este sentido, la identificación de nuevos biomarcadores que permitan una detección más temprana de la enfermedad es la mejor estrategia para optimizar el pronóstico del PDAC.

Los últimos avances en el conocimiento de la neoplasia pancreática han permitido conocer que estas células tumorales tardan varios años en producir metástasis, la causa de muerte más común en estos pacientes, lo que supone una oportunidad para la detección de la enfermedad antes de que se dé lugar esta dispersión [267].

4.2.2. Fuentes de biomarcadores en adenocarcinoma ductal pancreático

El examen del tejido tumoral pancreático es la aproximación más directa en la búsqueda de nuevos biomarcadores para PDAC, ya que es más probable que estos se encuentren en mayores concentraciones en el propio tumor. Sin embargo, aunque este enfoque puede conseguir grandes avances en el conocimiento de la carcinogénesis pancreática y su tratamiento más adecuado, en relación al aspecto diagnóstico presenta importantes limitaciones, como el difícil acceso a la muestra y el riesgo de complicaciones clínicas dada la localización de esta glándula. Por estas razones, el análisis del tejido pancreático no constituye una opción diagnóstica y de *screening* ideal para la rutina clínica [268].

Otra de las fuentes de biomarcadores estudiadas en diferentes investigaciones son las secreciones pancreáticas, las cuales constituyen una herramienta atractiva en este campo, dada su proximidad al tumor y su especificidad [268]. Sin embargo, la necesidad de endoscopio para recoger la muestra reduce su aplicabilidad diagnóstica y de *screening* [269] en el ámbito clínico.

La identificación de nuevos biomarcadores en muestras cuya recogida no requiera el uso de técnicas invasivas, constituye el enfoque diagnóstico más prometedor en PDAC [269]. En este sentido, la sangre periférica, las heces, la saliva, el microbioma oral e intestinal [25] o la orina [267], son algunos ejemplos de fuentes potencialmente útiles en oncología por su facilidad de muestreo.

La sangre periférica es un medio complejo y dinámico, cuyos componentes reflejan el estado fisiológico o patológico de un individuo [270]. De este modo, la sangre de pacientes oncológicos contiene numerosos componentes asociados al tumor, como proteínas, ADN, microARNs, células tumorales circulantes, etc., que podrían suponer una herramienta diagnóstica en PDAC [267]. El análisis de la sangre periférica para la búsqueda de biomarcadores en cáncer ha sido objeto de estudio en numerosas investigaciones. De hecho, en los últimos años se ha acuñado el término “biopsia líquida” para describir el uso de muestras de sangre con el fin de

detectar biomarcadores tumorales [271]. El empleo de la biopsia líquida en el ámbito diagnóstico oncológico constituye una opción muy interesante, ya que conlleva importantes ventajas, como su accesibilidad y, por tanto, su escasa invasividad en la obtención [25], su bajo coste [268] y su aplicabilidad en la clínica diaria [272].

El desarrollo de tecnologías de alto rendimiento, como los microarrays, ha permitido a muchos investigadores realizar extensos análisis genómicos, proteómicos y transcriptómicos [273], a partir de distintas fracciones sanguíneas, incluyendo suero, plasma y células mononucleares, con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores tumorales. Además, teniendo en cuenta la complejidad genética inherente al PDAC [10], estas aproximaciones han contribuido en gran medida al avance en el conocimiento sobre la heterogeneidad de esta enfermedad.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) incluyen linfocitos (células T, células B y células *Natural Killer* (NK)) y monocitos, fundamentales en la respuesta inmunitaria. Estas células viajan a través del torrente circulatorio alcanzando los distintos órganos y tejidos, con lo que están expuestas a todas las señales del organismo [274]. Esta extensa vigilancia inmune hace que las PBMCs puedan proporcionar información sobre el estado del organismo.

En relación al desarrollo del proceso oncológico, se ha observado que la mayoría de los pacientes con cáncer no desarrollan una respuesta antitumoral adecuada, lo que implica estrategias de evasión inmune por parte del tumor, como por ejemplo la secreción de factores inmunosupresores (como interleucina (IL) 3, IL-10 y TGF- β), y la inducción de la tolerancia inmune a antígenos tumorales específicos [275]. Dada esta influencia que ejerce el tumor sobre el sistema inmunitario, muchos estudios sugieren que el análisis de las PBMCs, tanto a nivel celular como molecular [274], podría reflejar la existencia de una neoplasia, lo que ha llevado a numerosas investigaciones para evaluar su utilidad como marcadores subrogados en cáncer [276].

Varios grupos de investigación han sugerido que la proporción de los distintos tipos de PBMCs en sangre podría ser un indicador del pronóstico en distintos tipos de neoplasias. Por ejemplo, se ha observado mayor cantidad de linfocitos T reguladores (Tregs), un tipo de células T cuya función es la supresión de la respuesta inmune, en pacientes con cáncer. Esta situación lleva a la inmunosupresión en el paciente, evitando que las células T reaccionen contra el tumor. Así, mayor número de Tregs en sangre periférica se ha asociado con peor pronóstico en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de páncreas [277-279].

Por otro lado, se ha demostrado la existencia de diferencias en el transcriptoma de las células del tejido tumoral respecto al tejido normal [280]. Sin embargo, el empleo de estas alteraciones en el diagnóstico del PDAC requiere la identificación de biomarcadores en tejidos más accesibles, evitando una biopsia de difícil acceso y que puede llevar a numerosas complicaciones. Además, en esta patología es de máxima importancia la identificación de biomarcadores de diagnóstico temprano, ya que es esencial para mejorar el pronóstico de los pacientes. En este sentido, las PBMCs han sido ampliamente evaluadas como biomarcadores en pacientes con PDAC [281-284], aunque ninguno de los paneles propuestos ha llegado a ser una realidad clínica. Los principales mecanismos que provocan este cambio en el transcriptoma de las PBMCs son el reconocimiento del tumor por parte del sistema inmune y la evasión de la respuesta inmune por parte del tumor. Dado que estos mecanismos se inician en fases muy tempranas del desarrollo tumoral, estos cambios observados en las PBMCs de pacientes con PDAC podrían constituir una herramienta eficaz para la detección precoz de la enfermedad, antes de que el tumor adquiera capacidad invasiva [283].

Objetivos

V. OBJETIVOS

1. Identificar mediante tecnología de microarrays, nuevos biomarcadores basados en el perfil de expresión génica diferencial de PBMCs, que permitan diferenciar pacientes con PDAC de sujetos sanos.
2. Determinar biomarcadores candidatos para el diagnóstico de PDAC a través de técnicas de metaanálisis capaces de integrar datos de expresión génica obtenidos mediante dos plataformas de microarrays diferentes.
3. Investigar la existencia de un perfil de expresión génica diferencial en PBMCs de pacientes con PDAC asociado al desarrollo de SR inducido por erlotinib.
4. Revisar los mecanismos inmunitarios implicados en el establecimiento y desarrollo del PDAC con el fin de estudiar el posible uso de nuestros biomarcadores como dianas inmunoterapéuticas.

Metodología y resultados

VI. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

La metodología y los resultados de esta Tesis Doctoral han sido objeto de publicación en las siguientes revistas científicas:

- Caba O, Prados J, Ortiz R, Jiménez-Luna C, Melguizo C, Alvarez PJ, Delgado JR, Irigoyen A, Rojas I, Pérez-Florido J, Torres C, Perales S, Linares A, Aránega A. **Transcriptional profiling of peripheral blood in pancreatic adenocarcinoma patients identifies diagnostic biomarkers.** *Dig Dis Sci.* 2014 Nov;59(11):2714-20. doi: 10.1007/s10620-014-3291-3.
- Jimenez-Luna C, Prados J, Ortiz R, Melguizo C, Torres C, Caba O. **Current status of immunotherapy treatments for pancreatic cancer.** *J Clin Gastroenterol.* 2016 Nov/Dec;50(10):836-848. doi: 10.1097/MCG.0000000000000623
- Caba O, Irigoyen A, Jimenez-Luna C, Benavides M, Ortuño FM, Gallego J, Rojas I, Guillen-Ponce C, Torres C, Aranda E, Prados J. **Identification of gene expression profiling associated with erlotinib-related skin toxicity in pancreatic adenocarcinoma patients.** *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016 Nov 15;311:113-116. doi: 10.1016/j.taap.2016.10.003.
- Irigoyen A, Caba O, Benavides M, Jimenez-Luna C, Gallego J, Ortuño FM, Guillen-Ponce C, Rojas I, Aranda E, Torres C, Prados J. **Integrative multi-platform meta-analysis of gene expression profiles in pancreatic ductal adenocarcinoma patients for identifying novel diagnostic biomarkers.** *BMC Genomics (sometido desde el 07 de abril de 2016).*

PUBLICACIÓN 1

Transcriptional profiling of peripheral blood in pancreatic adenocarcinoma patients identifies diagnostic biomarkers

Octavio Caba^a, Jose Prados^b, Raúl Ortiz^a, Cristina Jiménez-Luna^b, Consolación Melguizo^b, Pablo J. Álvarez^b, Juan R. Delgado^c, Antonio Irigoyen^c, Ignacio Rojas^d, Javier Pérez-Florido^e, Carolina Torres^f, Sonia Perales^f, Ana Linares^f, Antonia Aránega^b

^aDepartment of Health Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain

^bInstitute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada, Granada, Spain

^cDepartment of Oncology, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

^dDepartment of Computer Architecture and Computer Technology, University of Granada, Granada, Spain

^eGenomics and Bioinformatics Platform of Andalusia (GBPA), Seville, Spain

^fDepartment of Biochemistry and Molecular Biology I, University of Granada, Granada, Spain.

Dig Dis Sci. 2014 Nov;59(11):2714-20.

Abstract

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a lethal malignancy associated with poor survival rates. Fast detection of PDAC appears to be the most relevant strategy to improve the long-term survival of patients.

Aims: Our objective was to identify new markers in peripheral blood that differentiates between PDAC patients and healthy controls.

Methods: Peripheral blood samples from PDAC patients (n=18) and controls (n=18) were analyzed by whole genome cDNA microarray hybridization. The most relevant genes were validated by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) in the same set of samples. Finally, our gene prediction set was tested in a blinded set of new peripheral blood samples (n=30).

Results: Microarray studies identified 87 genes differentially expressed in peripheral blood samples from PDAC patients. Four of these genes were selected for analysis by RT-qPCR, which confirmed the previously observed changes. In our blinded validation study, the combination of *CLEC4D* and *IRAK3* predicted the diagnosis of PDAC with 93% accuracy, with a sensitivity of 86% and specificity of 100%.

Conclusions: Peripheral blood gene expression profiling is a useful tool for the diagnosis of PDAC. We present a validated four-gene predictor set (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1*, and *IRAK3*) that may be useful in PDAC diagnosis.

Keywords

Pancreatic ductal adenocarcinoma · Biomarkers · Peripheral blood · Gene expression profiling · cDNA microarrays

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most common histological type of pancreatic cancer [1], is a lethal malignancy with five-year survival rates of 15% in patients with resectable disease [2–4]. However, most patients are diagnosed with advanced disease (locally advanced or metastatic) [5], because there are currently no tumor markers that allow reliable and fast screening. Some tumor markers have been associated with the diagnosis of PDAC [6, 7]. Antigen CA 19-9 is the most frequently employed [8], although elevated serum levels have been detected in only 65% of patients with resectable PDAC and are often not reliable to identify this disease [9]. Microarray techniques have been used to determine cancer gene expression profiling and may be used as cancer marker [10]. The first tissue-based cDNA microarray study in PDAC was published by the Lerach group in 1997 [11], and, in this context, some genes with differential expression between normal and tumor tissue have been proposed for PDAC diagnosis, staging, and prognosis [12–14]. However, the difficulty and potential complications of obtaining a pancreas biopsy limits its clinical application. Peripheral blood is an accessible source of cells for the investigation of cancer markers [15]. In fact, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) develop a complex transcriptional response when in contact with the microenvironment of the altered tissue [16], modifying the gene expression profile of these cells [15, 17]. Hence, PBMCs have emerged as surrogate marker of several diseases, including inflammatory (e.g., chronic pancreatitis) [18] and malignant [19] conditions. Most serum tumor biomarkers, such as CA 19-9, are released from cancer cells and increase with greater tumor burden [20], while the evasion by cancer cells of the immune system can induce differential gene expression in PBMCs at the onset of premalignant disease [21, 22]. Therefore, analysis of the gene expression profile in PBMCs may offer a reliable tool for a fast detection of a malignant lesion.

In this study, microarray-based gene expression profiling of PBMC samples from PDAC patients revealed a panel of 87 genes with differential expression in comparison with a healthy control group. Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) of 4 selected genes (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1*, and *IRAK3*) was used to verify this altered expression. Finally, the diagnostic capacity for PDAC of the selected genes was tested in a new set of 30 blinded samples. The aim of this study was to detect differential gene expression in PBMCs from patients with PDAC that may be useful for the diagnosis of this disease.

Materials and Methods

Study Population

From January 2009 to July 2012, all patients with unresectable PDAC at the Virgen de las Nieves University Hospital were recruited. The diagnosis of PDAC was based on clinical evaluation and imaging studies, which were histologically confirmed by surgery or imaging-guided biopsy. Finally, 18 patients and 18 gender-, age-, and habit matched healthy controls were included. The study was approved by the Ethics Committee of the Virgen de las Nieves University Hospital in Granada, and all clinical investigations have been conducted (seven) according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients and controls before their enrollment in the study.

Blood Collection and Isolation of Total RNA from PBMCs

Before any type of chemotherapy was received, peripheral blood samples (12ml) of the patients (all from Virgen de las Nieves University Hospital) and controls were collected in PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytix) to achieve immediate and persistent stabilization of the RNA. Samples were stored at room temperature for 24h. The PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytix) was used for RNA isolation in accordance with manufacturer's instructions. The concentration of purified RNA was assessed by absorbance at 260nm in a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific), and the quality was assessed by using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). All samples had an RNA integrity number (RIN) >7.0 and a28S:18S rRNA ratio >1.0.

cDNA Microarray Analysis of PBMCs

Whole genome cDNA microarray hybridization of PBMC samples was performed to identify potential PDAC markers. Microarray hybridization, scanning, and analysis were carried out by the Genomic Unit of the Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine (CABIMER, Seville). Affymetrix microarray-based gene expression profiling was done in PBMC samples from patients with PDAC and healthy controls, using GeneChip_Human Gene ST 1.0 Arrays (Affymetrix Inc.). Briefly, 1µg of high-quality total RNA was used to synthesize double-stranded cDNA, and biotin-tagged cRNA was produced. This cRNA was recovered and purified and then hybridized to the chips (overnight at 45°C). After being washed and stained, arrays were scanned with a GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix Inc.) following the manufacturer's protocol.

Hybridization data were processed and normalized using Robust Multi-array Average (RMA) analysis from the Bioconductor package oligo [23]. From the normalized data obtained, we selected those genes most likely to be differentially expressed in PDAC patients versus controls by analyzing the gene expression microarray data with the linear models for microarray data (LIMMA) software package [24].

Validation of Microarray Data by RT-qPCR

Microarray hybridization results for the selected genes were validated by RT-qPCR using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied BioSystems). One microgram of previously obtained RNA was reverse-transcribed into cDNA by employing the High Capacity cDNA ReverseTranscription Kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems) in a final volume of 20 μ L with the following program: 25°C 10 min, 37°C 120 min, and 85°C 5 min. We utilized the same set of 18 PBMC samples from the PDAC patients, while a mixture of cDNA from the 18 healthy subjects served as control. Each sample was run in quadruplicate, and the *GAPDH* gene was used to normalize the results. The cDNA was mixed with TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and predeveloped TaqMan assays targeting *GADPH* and the selected genes *ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1*, and *IRAK3* (reference number Hs00944018_m1, Hs00431023_m1, Hs01546812_m1, and Hs00936103_m1, respectively from Applied Biosystems) corresponding to the selected genes in a 20 μ L reaction volume and subjected to the following conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min in 96-well optical reaction plates (Applied Biosystems). The concentration of each primer and probe was optimized before use. Dissociation curves were generated at the end of the amplification to verify the absence of primer-dimer formations.

The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was applied to determine the correlation between microarray and RT-qPCR results according to the fold change in gene expression obtained. Using the same control RNA as that employed in the microarray, the median fold change in expression between PDAC patients and healthy controls was calculated for each gene and compared with the microarray hybridization result.

Correlation Between Expression of the Selected Genes with Clinicopathological Characteristics in PDAC

The Spearman's rank correlation coefficient, the nonparametric Mann–Whitney test, and the Fisher's test were used to determine any correlations between the expression of the proposed four PDAC marker genes and the clinicopathological characteristics of

the PDAC patients. Study variables were survival time, time interval to tumor progression, sex, age, history of pancreatitis and type II diabetes mellitus pre-PDAC diagnosis, smoking and alcohol habits, CA 19-9 and CEA levels at the PDAC diagnosis, TNM status, and tumor stage. SPSS 19.0 software (SPSS Company, Chicago, IL) was used for all data analyses, and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Blinded Validation of the Gene Predictor Set

Once our predictor set of genes was established, it was validated by RT-qPCR in a new set of 30 randomly selected samples (15 PDAC patients and 15 healthy individuals) with matching clinicopathological characteristics to previous PDAC patients. The statistician was blinded to identity of the samples. The Mann–Whitney test was used to compare the values of the four markers between the PDAC group and the control group. Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis was used to evaluate the diagnostic power of the selected genes [area under the curve (AUC), p value of the Wald's test, sensitivity, and specificity]. Finally, logistic regression analysis was performed to test the optimal combination of genes for the marker set. As above, all data analyses were performed using SPSS 19.0 software, and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Patients' Characteristics

The study included 18 PDAC patients and 18 healthy controls. Table 1 exhibits the characteristics of the patients and controls: Patients were nine men (50%) and nine women (50%) with a mean age of 61.4 years (range 37–76 years). No patient had a history of pancreatitis, but seven (38.9%) had a history of type II diabetes mellitus before the PDAC diagnosis; 33.3% of the patients were smokers and 5.6% were alcohol consumers. At the diagnosis, 12 patients (66.6%) had stage IV tumors and six (33.4%) had stage III tumors. Healthy controls were 10 men (55.55%) and eight women (45.45%) with a mean age of 60.39 years (range 35–74 years). No subject had a history of pancreatitis or type II diabetes mellitus; four (22.22%) of the controls were smokers and three (16.67%) were alcohol consumers.

Characteristic	No. case (%) (n=18)
<i>Sex</i>	
Male	9 (50 %)
Female	9 (50 %)
<i>Age</i>	
Mean \pm SD	61.4 \pm 10.7
Maximum	76
Minimum	37
<i>Pancreatitis</i>	
Yes	0 (0 %)
No	18 (100 %)
<i>Diabetes</i>	
Yes	7 (38.9 %)
No	11 (61.1 %)
<i>Smoker</i>	
Yes	6 (33.3 %)
No	12 (66.7 %)
<i>Alcohol consumer</i>	
Yes	1 (5.6 %)
No	17 (94.4 %)
<i>Pathological staging</i>	
III	6 (33.3 %)
IV	12 (66.7 %)

Table 1 Characteristics of PDAC patients used in the study

Differential Gene Expression Profiling in PBMCs from PDAC Patients

Data deposition: The data of microarrays reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> with the accession number GSE49641. After normalization of the data, the LIMMA software package was used to analyze global gene expression changes between samples from 18 PDAC patients and those from 18 healthy controls, identifying 87 differentially expressed genes (Supplementary Table 1, Supplementary Table 2, and Fig. 1). Among these, nine genes were found to have a \geq two-fold differential expression between the groups (seven upregulated and two downregulated; Table 2).

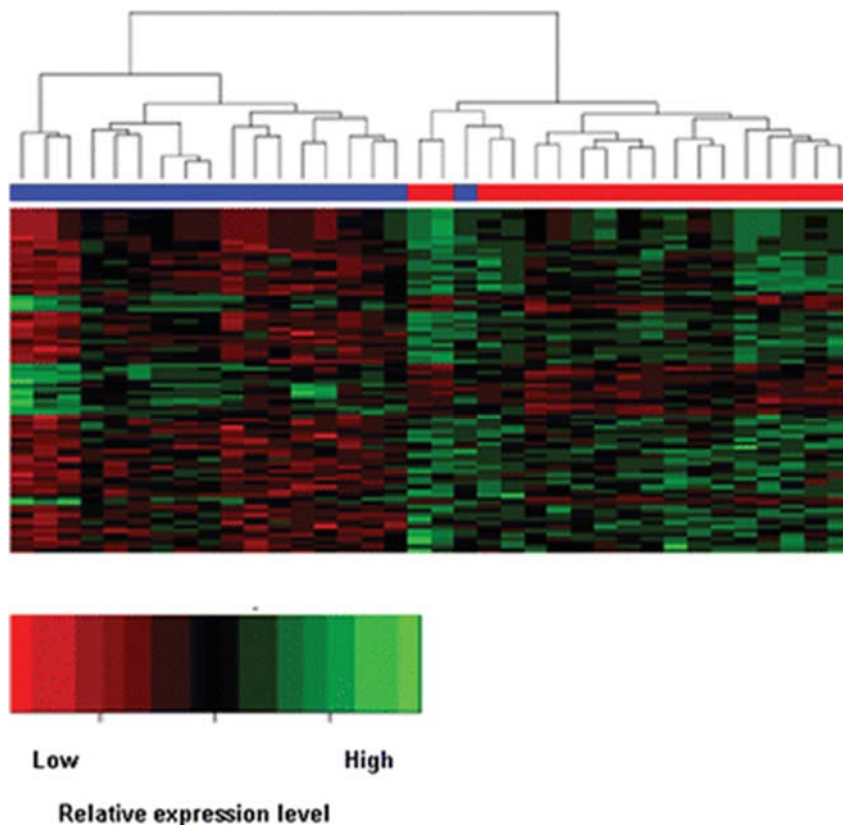


Fig. 1 Global gene expression analysis in PBMCs from PDAC patients versus healthy controls. Hierarchical cluster analysis of global gene expression profile by cDNA whole genome microarray comparing healthy controls and PDAC samples using the 87 genes found to be statistically differentially expressed between both groups ($p < 0.05$, U test). Hierarchical cluster analysis of the 87 differentially expressed genes comparing healthy control and PDAC samples using all genes found to be statistically differentially expressed between both groups. *Pseudocolors* indicate differential expression: *black* no change; *green* upregulation; *red* downregulation

Gene	Gene description	Acc ID	FC	p value
ANKRD22	Ankyrin repeat domain 22	NM_144590	3.26	<0.001
ARG1	Arginase 1	NM_000045	2.83	<0.001
S100A8	S100 calcium binding protein A8	NM_002964	2.79	<0.001
CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	NM_080387	2.36	<0.001
VNN1	Vanin 1	NM_004666	2.34	<0.001
F5	Coagulation factor V	NM_000130	2.11	<0.001
IRAK3	Interleukin 1 receptor-associated kinase 3	NM_028679	2.10	<0.001
FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3	NM_005449	-2.02	<0.001
LRRN3	Leucine rich repeat neuronal 3	NM_018334	-2.57	<0.001

Accession ID Sequence accession Identifier, *FC* Fold change

Table 2 Genes upregulated and downregulated in PBMCs of PDAC patients (Data for LIMMA statistical analysis)

RT-qPCR Validation of Selected Genes

Out of the nine PBMC genes identified as differentially regulated in PDAC patients by microarray analysis, the most relevant genes were selected according to their Gene Ontology (GO) biological process term. Given the nature of the samples, we selected four genes related to the innate immune response and/or protein binding in blood plasma (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1*, and *IRAK3*).

These genes were analyzed in quadruplicate in the same 18 samples from PDAC patients and 18 control samples as in the microarray analysis. All four genes showed similar changes in median fold expression to those obtained in the microarray analysis: *ANKRD22* gene appear a bit more upregulated in PDAC patients in the microarrays studies (3.26) than in RT-qPCR (3.06); the same effect was observed in *CLEC4D* (2.36 vs 2.21) and *VNN1* (2.34 vs 2.17) genes; *IRAK3* showed the lowest difference between the values obtained by microarray and RT-qPCR (2.1 vs 2.07) (Fig. 2).

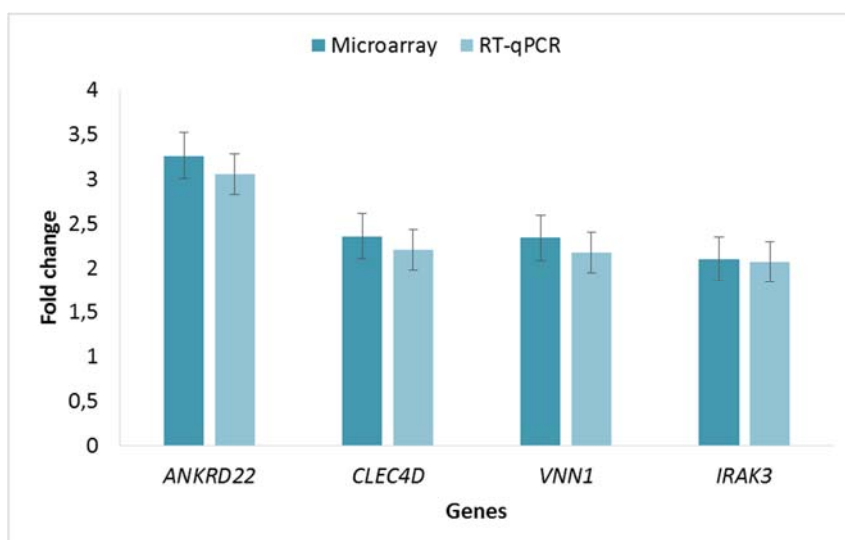


Fig. 2 Comparison of median fold change (pancreatic ductal adenocarcinoma/normal) of selected genes by microarray and quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Microarray results were validated by RT-qPCR using TaqMan primers. Four genes shown to be upregulated by microarray (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1*, and *IRAK3*) were validated in the same set of 18 peripheral blood mononuclear cell samples from the PDAC patients, while a mixture of cDNA from the 18 healthy subjects served as control. The fold change in gene expression was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using the same control RNA as that employed in the microarray. The median fold change in expression between PDAC patients and healthy controls was calculated for each gene and compared with the microarray result

Correlation Between Selected Genes with Clinicopathological Characteristics in PDAC

Possible correlations between expression of the four selected PBMCs genes and the clinicopathological characteristics of the PDAC patients were evaluated by dividing the PDAC samples according to their clinicopathological characteristics. However, no significant correlation was found between the expression level of any of the selected genes in PDAC patients and the clinicopathological characteristics studied.

Blinded Validation of the Gene Predictor Set

In order to test the potential diagnostic utility of our gene predictor set, RT-qPCR was used to obtain values in 30 new PBMC samples. These data were used to classify the samples as deriving from PDAC patient or healthy control in a blinded manner, using ROC methodology. The proposed genes showed significant AUC values in these new samples. The highest AUC values were observed for *CLEC4D* (0.974) and *IRAK3* (0.995) (Table 3), and the combined analysis of these two genes predicted PDAC diagnosis with 93% accuracy, offering a sensitivity of 86% and specificity of 100%.

Gene	AUC	<i>p</i> value	Sensitivity	Specificity	Sum
ANKRD22	0.933	0.17	0.933	0.846	1.779
CLEC4D	0.974	0.32	0.846	0.933	1.779
VNN1	0.881	0.09	0.867	0.786	1.653
IRAK3	0.995	0.23	0.933	1.000	1.933

AUC area under curve, *p* value of the Wald's test, *Sum* of sensitivity and specificity

Table 3 Receiver operating characteristic (ROC) analysis of the four selected genes for discrimination between PDAC patients and healthy controls

Discussion

An earliest diagnosis of PDAC is essential for improving the prognosis of these patients [2]. However, the symptoms of this malignancy are difficult to detect, and only 15–20% of PDAC patients are diagnosed with resectable disease [25]. The failure of a large number of the studies designed to discover novel PDAC markers may be attributable to an inappropriate selection of samples. There remains an urgent need to identify novel non-invasive biomarkers to enhance PDAC detection.

Over recent years, it has been well documented that the presence of some malignancies, such as cancer, impacts on PBMC gene expression profiling, suggesting the potential suitability of these genes as diagnostic and prognostic markers. Whitney et al. [15] published the first study of this type in patients with diffuse large B cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. In the same year, other authors reported 100% accuracy in the diagnosis of advanced renal cell carcinoma using a panel of 8 differentially expressed genes in blood samples [17]. More recently, Huang et al. [26] described 48 PBMC genes that were differentially expressed between pancreatic cancer (PC) patients and healthy controls. Baine et al. [22] proposed a set of eight genes for PC diagnosis, and this panel was found to be superior to CA 19-9 for distinguishing between resectable PC and chronic pancreatitis [27].

A recent comparison of PBMCs between PDAC patients and healthy controls found that RT-qPCR determined olfactomedin 4 expression may be a prognostic marker for this cancer, although the study sample was small (5 patients and controls), and the values obtained by microarray technology (4.46) and RT-qPCR (4.80) were somewhat different [28]. The present extensive analysis of PBMC gene expression profiles was performed in 18 PDAC patients and 18 healthy controls. Among the genes found to be significantly upregulated in the PDAC patients by microarray analysis, we selected

those genes related to the innate immune response and/or protein binding in blood plasma (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1*, and *IRAK3*).

The gene showing the highest upregulation was the ankyrin repeat domain 22 gene (*ANKRD22*), with a value of 3.06 in the RT-qPCR analysis. The function of *ANKRD22* remains unknown, but it has been patented by Rosenthal et al. as a possible biomarker for several types of cancer and by Brichard et al. for identification of the patient response to cancer immunotherapy. Baine et al. [22] indicated an over-expression of *ANKRD22* in PBMCs of PC patients but the difference (1.676-fold by microarray and 1.16-fold by RT-qPCR) was not statistically significant, unlike in the present study. This discrepancy may be attributable to differences in patient selection. Their patients were in different stages of the disease and undergoing distinct therapies, in contrast to the homogeneity of our patient population, allowing us to avoid bias from the influence of stage or treatment on the gene expression [29].

CLEC4D and *VNN1* were also selected as differentially expressed genes in the present study. The product of *CLEC4D* is an endocytic receptor involved in antigen uptake at infection sites, either for clearance of the antigen or for its processing and further presentation to T cells [30]. The protein encoded by *VNN1* is an ectoenzyme anchored to the surface of epithelial cells that is involved in lymphocyte migration, cell adhesion, and colonization of the thymus by hematopoietic precursor cells [31]. Both *CLEC4D* and *VNN1* genes were included by Marshall et al. [32]. in a seven-gene biomarker panel for discriminating colorectal cancer patients using blood RNA samples, which showed an accuracy of 71% with a sensitivity of 72% and specificity of 70%, Yip et al. [33] used the same panel and reported an accuracy of 70% with a sensitivity of 61% and specificity of 77% in a study of 99 colorectal cancer patients. *VNN1* combined with *MMP9* upregulation has been also observed by microarray and RT-qPCR in type II diabetics who developed PC in comparison with those who did not [26], suggesting that these genes may be useful for detecting early PC in this risk group. In our study, no difference in *MMP9* gene expression was observed between the patients and healthy controls, probably because of the relatively low prevalence of type II diabetes in our patients.

Microarray and RT-qPCR analysis also showed *IRAK3* gene over-expression in the PBMCs of PDAC patients versus the controls. This gene has been related to immune system modulation mediated by different processes, such as sepsis-induced immunosuppression [34], and to the development of tolerance to cancer cells in human monocytes [35]. *IRAK3* increases the expression of cytokines and other cellular

mediators as well as co-stimulatory molecules, acting as a negative regulator of innate immunity signaling processes [36]. *IRAK3* upregulation has been reported in monocytes from chronic myeloid leukemia patients and from cancer patients with metastases, contributing to tumor formation and growth [35].

The diagnosis capacity of our four proposed genes was validated in a blinded analysis of 30 new samples, confirming that they were able to discriminate between patients and controls. Once our predictor set of four genes was established, we performed a statistical analysis to determine the gene combination offering the highest accuracy for PDAC diagnosis. The results demonstrated that *CLEC4D* and *IRAK3* was the optimum combination for differentiating between PDAC patients and healthy controls, obtaining a sensitivity of 86% and specificity of 100%.

In conclusion, recent research findings have demonstrated that PBMCs gene expression profiling is useful for the diagnosis of various diseases, including cancer. After microarray analysis and validation by RT-qPCR, we demonstrated a significant differential gene expression in PBMCs of PDAC patients in relation to healthy controls, with an upregulation of four genes (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1*, and *IRAK3*). Further studies are warranted to test the effectiveness of this panel for the diagnosis of one the most lethal cancers worldwide.

Acknowledgments This work is part of the Doctoral Thesis of Cristina Jiménez-Luna. The authors are grateful to the Genomics Unit at the Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine (CABIMER) for assistance with the microarray technology. They also thank Isabel Puertas (Virgen de las Nieves University Hospital) for assisting with the recruitment of the patients and the collection of their clinicopathological characteristics and Manuela Expósito (FIBAO Foundation) for help with the statistical analysis. This investigation was funded by FEDER, Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I), Instituto de Salud Carlos III (FIS) through projects no. PI12/01935 and EC08/00009 and CEI BioTic project no. mP_BS_36.

Conflict of interest None.

References

1. Seufferlein T, Bachet JB, Van Cutsem E, Rougier P. Pancreatic adenocarcinoma: ESMO–ESDO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23:vii33–vii40.
2. Hariharan D, Saied A, Kocher HM. Analysis of mortality rates for pancreatic cancer across the world. *HPB.* 2008;10:58–62.
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60:277–300.
4. Sharma C, Eltawil KM, Renfrew PD, Walsh MJ, Molinari M. Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990–2010. *World J Gastroenterol.* 2011;17:867–897.
5. Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, et al. The role of stromal pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9:454–467.
6. Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, et al. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med.* 2009;6:e1000046.
7. Rückert F, Pilarsky C, Grützmann R. Serum tumor markers in pancreatic cancer—recent discoveries. *Cancers.* 2012;2:1107–1124.
8. Locker G, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO: ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:5313–5327.
9. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33:266–270.
10. Caba O, Ortiz R, Alvarez P, et al. Patented biomarkers of peripheral blood for the early detection of cancer. *Recent Pat Biomark.* 2012;2:17–28.
11. Müller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, et al. Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene.* 1997;14:2729–2733.

12. Karanjawala ZE, Illei PB, Ashfaq R, et al. New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:188–196.
13. Rogers A, Smith MJ, Doolan P, et al. Invasive markers identified by gene expression profiling in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2011;12:130–140.
14. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Neoplasia*. 2010;12:807–817.
15. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:1896–1901.
16. Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature*. 2003;425:905.
17. Twine NC, Stover JA, Marshall B, et al. Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:6069–6075.
18. Bluth M, Lin Y, Zhang H, Viterbo D, Zenilman M. Gene expression profiles in cells of peripheral blood identify new molecular markers of acute pancreatitis. *Arch Surg*. 2008;143:227–234.
19. Grubor V, Krasnitz A, Troge JE, et al. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). *Blood*. 2009;113:1294–1303.
20. Steer HJ, Lake RA, Nowak AK, Robinson BW. Harnessing the immune response to treat cancer. *Oncogene*. 2010;29:6301–6313.
21. Showe MK, Vachani A, Kossenkov AV, et al. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells can distinguish patients with non-small cell lung cancer from patients with nonmalignant lung disease. *Cancer Res*. 2009;69:9202–9210.
22. Baine MJ, Chakraborty S, Smith LM, et al. Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. *PLoS One*. 2011;6:e17014.

23. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics*. 2010;26:2363–2367.
24. Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, eds. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor*. New York, NY: Springer; 2005:397–420.
25. Giovannetti E, van der Velde A, Funel N, et al. High-throughput microrna (miRNAs) arrays unravel the prognostic role of MiR-211 in pancreatic cancer. *PLoS One* 2012;7:e49145.
26. Huang H, Dong X, Kang MX, et al. Novel blood biomarkers of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus identified by peripheral blood-based gene expression profiles. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1661–1669.
27. Baine MJ, Menning M, Smith LM, et al. Differential gene expression analysis of peripheral blood mononuclear cells reveals novel test for early detection of pancreatic cancer. *Cancer Biomark*. 2011;11:1–14.
28. Yan H, Lu D, Xu L, Xie Q, Dong X, Wu Y. Increased expression level of Olfactomedin4 in peripheral blood mononuclear cells of pancreatic adenocarcinoma patients. *Hepatology*. 2011;58:1354–1359.
29. Chakraborty S, Baine MJ, Sasson AR, Batra SK. Current status of molecular markers for early detection of sporadic pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1815:44–64.
30. Arce I, Martínez-Muñoz L, Roda-Navarro P, Fernandez-Ruiz E. The human C-type lectin CLECSF8 is a novel monocyte/macrophage endocytic receptor. *Eur J Immunol*. 2004;34:210–220.
31. Jansen PA, Kamsteeg M, Rodijk-Olthuis D, et al. Expression of the vanin gene family in normal and inflamed human skin: induction by proinflammatory cytokines. *J Invest Dermatol*. 2009;129:2167–2174.
32. Marshall KW, Mohr S, Khettabi FE, et al. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010;126:1177–1186.

33. Yip KT, Das PK, Suria D, Lim CR, Ng GH, Liew CC. A case controlled validation study of a blood-based seven-gene biomarker panel for colorectal cancer in Malaysia. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:128.
34. Deng JC, Cheng G, Newstead MW, et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J Clin Invest*. 2006;116:2532–2542.
35. del Fresno C, Otero K, Gómez-García L, et al. Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *Immunol*. 2005;174:3032–3040.
36. Xie Q, Gan L, Wang J, Wilson I, Li L. Loss of the innate immunity negative regulator IRAK-M leads to enhanced host immune defense against tumor growth. *Mol Immunol*. 2007;44:3453–3461.

SUPPLEMENTARY MATERIAL**Supplementary Table 1** Upregulated genes differentially expressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients

Probe set ID	Name	Description	Entrez gene ID	Fold change	P value
7934898	ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	118932	3.26	9.96e-06
8122058	ARG1	arginase, liver	383	2.83	0.00922
7920244	S100A8	S100 calcium binding protein A8	6279	2.79	0.00314
7953749	CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	338339	2.36	0.00293
8129618	VNN1	vanin 1	8876	2.34	0.00314
7922174	F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	2153	2.11	0.00084
7956878	IRAK3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	11213	2.1	0.00084
7961440	PLBD1	phospholipase B domain containing 1	79887	1.95	0.000244
8083272	GYG1	glycogenin 1	2992	1.89	0.00084
8025285	C19orf59	chromosome 19 open reading frame 59	199675	1.89	0.0037
7909877	MOSC1	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1	64757	1.88	0.00146

8103728	HMGB2	high-mobility group box 2	3148	1.88	0.00314
8023043	PSTPIP2	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	9050	1.77	0.00084
8096116	AGPAT9	1-acylglycerol-3- phosphate O- acyltransferase 9	84803	1.72	0.000859
8094228	BST1	bone marrow stromal cell antigen 1	683	1.6	0.00293
8009476	MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	5608	1.57	0.00678
8146000	ADAM9	ADAM metallopeptidase domain 9	8754	1.57	0.00914
8122554	RAB32	RAB32, member RAS oncogene family	10981	1.52	0.00452
8057677	SLC40A1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	30061	1.52	0.00474
<i>Entrez gene ID, Sequence accession Identifier</i>					

Supplementary Table 2 Downregulated genes differentially expressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients

Probe set ID	Name	Description	Entrez gene ID	Fold change	P value
8153175	TRAPPC9	trafficking protein particle complex 9	83696	0.763	0.00707
8174761	NKAPP1	NFKB activating protein pseudogene 1	158801	0.761	0.00828
7986789	ATP10A	ATPase, class V, type 10A	57194	0.755	0.00314
8156770	GALNT12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12)	79695	0.753	0.00377
7981460	PPP1R13B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13B	23368	0.751	0.00314
7963092	FMNL3	formin-like 3	91010	0.738	0.00314
8012423	CTC1	CTS telomere maintenance complex component 1	80169	0.735	0.00973
7925089	PCNXL2	pecanex-like 2 (Drosophila)	80003	0.732	0.00526
7953111	ITFG2	integrin alpha FG-GAP repeat containing 2	55846	0.727	0.00779
8169083	ZCCHC18	zinc finger, CCHC domain containing 18	644353	0.725	0.00482
7934451	AGAP5	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 5	729092	0.723	0.00424
7912537	DHRS3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	9249	0.722	0.00624

8039062	ZNF665	zinc finger protein 665	79788	0.72	0.00564
7959638	TCTN2	tectonic family member 2	79867	0.718	0.00911
7933427	AGAP5	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 5	729092	0.717	0.00383
8114300	KLHL3	kelch-like 3 (Drosophila)	26249	0.713	0.00175
7927353	AGAP5	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 5	729092	0.71	0.00847
7933331	AGAP5	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 5	729092	0.71	0.00847
7936463	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	3983	0.71	0.00973
8079058	NA	NA	NA	0.709	0.00314
7933574	AGAP7	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 7	653268	0.707	0.00314
7927552	AGAP6	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 6	414189	0.703	0.00348
7984364	SMAD3	SMAD family member 3	4088	0.703	0.00427
7933252	AGAP4	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 4	119016	0.699	0.00377
8103025	ZNF827	zinc finger protein 827	152485	0.698	0.00314

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

7933405	AGAP4	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 4	119016	0.697	0.0033
8120654	KCNQ5	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5	56479	0.696	0.00084
7918487	DENND2D	DENN/MADD domain containing 2D	79961	0.695	0.00383
8052798	AAK1	AP2 associated kinase 1	22848	0.692	0.00314
7932326	CUBN	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	8029	0.691	0.00546
8039674	ZNF154	zinc finger protein 154	7710	0.688	0.00383
8052803	AAK1	AP2 associated kinase 1	22848	0.686	0.00447
8136641	TAS2R3	taste receptor, type 2, member 3	50831	0.67	0.00314
7899023	LDLRAP1	low density lipoprotein receptor adaptor protein 1	26119	0.669	0.00314
7996772	SLC7A6	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 6	9057	0.669	0.00952
8115543	EBF1	early B-cell factor 1	1879	0.668	0.00707
8085716	SATB1	SATB homeobox 1	6304	0.662	0.00488
8157800	MIR181A2	microRNA 181a-2	406954	0.656	0.00321

8146687	ADHFE1	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1	137872	0.652	0.00606
7909350	CR2	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2	1380	0.65	0.00433
8144699	NA	NA	NA	0.648	0.00314
8143441	KIAA1147	KIAA1147	57189	0.646	0.00393
8067040	NFATC2	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	4773	0.641	0.00398
7972888	PCID2	PCI domain containing 2	55795	0.636	0.00293
8045974	SLC4A10	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10	57282	0.626	0.000138
8068350	FLJ46020	FLJ46020 protein	400863	0.624	0.00084
8112582	NA	NA	NA	0.621	0.00678
8120967	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	4907	0.619	0.00314
8142538	NA	NA	NA	0.614	0.00546
8050115	C2orf46	chromosome 2 open reading frame 46	339789	0.61	0.00162
7969794	LOC100132099	FRSS1829	100132099	0.605	0.00406

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

8125857	NA	NA	NA	0.599	0.00922
7916018	NA	NA	NA	0.597	0.0032
8106660	RASGRF2	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2	5924	0.594	0.00305
7921275	FCRL3	Fc receptor-like 3	115352	0.593	0.00314
8081710	SIDT1	SID1 transmembrane family, member 1	54847	0.59	0.002
8111358	NA	NA	NA	0.59	0.00482
8054254	AFF3	AF4/FMR2 family, member 3	3899	0.578	0.00451
7963851	KIAA0748	KIAA0748	9840	0.578	0.00718
8128247	BACH2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	60468	0.576	0.00084
8108050	TCF7	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	6932	0.564	0.00314
8082086	PARP15	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 15	165631	0.564	0.00314
8079383	CCR3	chemokine (C-C motif) receptor 3	1232	0.56	0.00452
8047370	NIF3L1	NIF3 NGG1 interacting factor 3-like 1 (S. pombe)	60491	0.557	0.00383

8049528	LRRFIP1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	9208	0.531	0.00314
7902452	AK5	adenylate kinase 5	26289	0.506	0.00377
7923917	FAIM3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3	9214	0.493	0.00393
8135488	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3	54674	0.39	0.00482
<i>Entrez gene ID, Sequence accession Identifier</i>					

PUBLICACIÓN 2

Current status of immunotherapy treatments for pancreatic cancer

Cristina Jiménez-Luna*, Jose Prados*, Raúl Ortiz*†, Consolación Melguizo*,
Carolina Torres‡, Octavio Caba*†

*Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada,
Granada, Spain

†Department of Health Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain

‡Department of Biochemistry and Molecular Biology I, University of Granada, Granada,
Spain.

J Clin Gastroenterol. 2016 Nov/Dec;50(10):836-848.

Abstract

Pancreatic cancer (PC) is a lethal disease representing the seventh most frequent cause of death from cancer worldwide. Resistance of pancreatic tumors to current treatments leads to disappointing survival rates, and more specific and effective therapies are urgently needed. In recent years, immunotherapy has been proposed as a promising approach to the treatment of PC, and encouraging results have been published by various preclinical and clinical studies. This review provides an overview of the latest developments in the immunotherapeutic treatment of PC and summarizes the most recent and important clinical trials.

Keywords

Immunotherapy, pancreatic cancer, clinical trial

INTRODUCTION

Cancer disease results from the uncontrolled proliferation of abnormal cells that can spread throughout the body, generating metastasis. Carcinogenesis has been revealed as a multistep process¹ in which tumor cells develop sustained growth, resistance to cell death, induction of angiogenesis, alteration of energy metabolism, and immune system evasion, among other hallmarks.²

The link between the immune system and tumor development has long been investigated.³ In 1909, Ehrlich⁴ first hypothesized that the immune system continuously eliminates nascent transformed cells before their clinical detection. Several years later, Burnet and Thomas⁵ proposed the immune surveillance theory, according to which the immune system exerts a critical role in recognizing and eradicating nascent transformed cells, acting as a guard against malignant transformation. Over recent years, immunosurveillance has become considered as a part of a broader concept known as cancer immunoediting, which describes more accurately the relationship between the immune system and cancer.⁶

The model of cancer immunoediting explains tumor development as a dynamic process composed of 3 phases: elimination, equilibrium, and escape⁷ (Fig. 1). During this process, the tumor phenotype is determined by the host immune response.⁸ In the elimination or protection phase, immune surveillance destroys transformed cells by adaptive and innate immune responses,^{9,10} protecting the host from tumor development. In the equilibrium phase, the immune system eliminates tumor cells, but

this process leads to the emergence of resistant tumor cells with reduced immunogenicity, producing a balance between the removal of tumor cells and the production of resistant tumor cells.^{9,11} However, if this equilibrium phase is disrupted, the process can progress to the last step, the escape phase, triggering tumor growth.^{6,12}

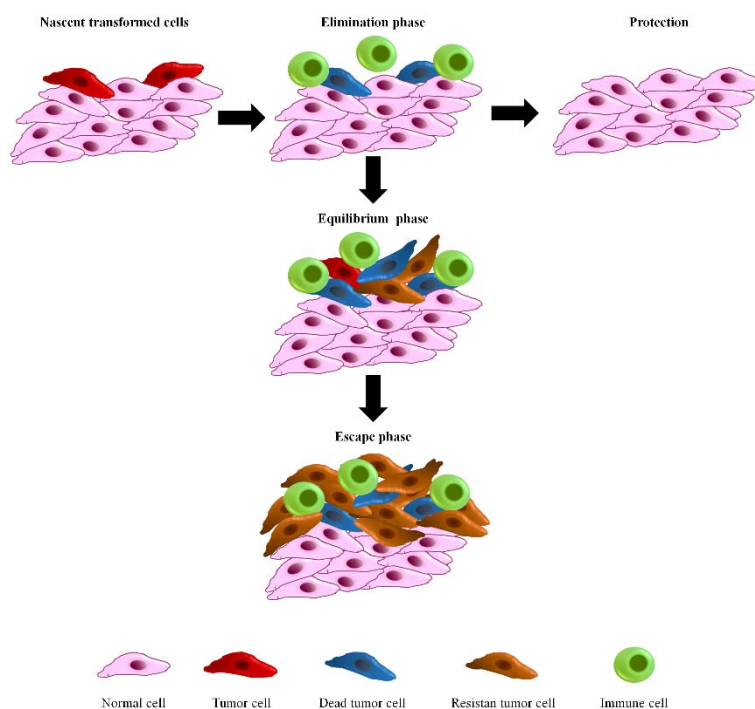


FIGURE 1. Schematic cancer immunoediting. The process of cancer immunoediting is conceived as 3 phases: elimination, equilibrium, and escape.

IMMUNOTHERAPY

Although our knowledge of the mechanisms underlying cancer has markedly improved over recent years, contributing to significant progress in anticancer therapies, the outcomes of most current treatments remain unsatisfactory.

Gemcitabine therapy is the first-line treatment against advanced pancreatic cancer (PC), but survival outcomes are <6 months for metastatic disease and between 9 and 12 months for locally advanced disease.^{13,14} Cytotoxic agents combined with gemcitabine-based regimens have shown no significant survival benefit.¹⁵ Treatment with FOLFIRINOX, a combination of fluorouracil, leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin, has improved survival rates (11.1 vs. 6.8 mo for gemcitabine),¹⁶ although these remain inadequate.¹⁷

The capacity of the immune system to mount an antitumor immune response has been widely demonstrated in various types of cancer,¹⁸ including PC.¹⁹ Thus, it is well established that T cells can detect tumor cells by recognizing tumor-associated antigens (TAAs) and tumor-specific antigens.^{20,21} However, their recognition of TAAs is not sufficient to develop an effective immune response; in addition, the limitation of inhibitory signals from immune checkpoints and the presence of positive costimulatory molecules are required.²²

There are many strategies by which tumor cells can escape from immune control. In this regard, various studies have demonstrated the dual effect on the immune response produced during the course of PC, which triggers not only an antitumor response but also a protumor effect,^{23,24} encouraging immunosuppression and an anti-inflammatory environment.¹⁷ Several tumor-infiltrating immune cell populations have shown this dual role³ and have been related to the prognosis of PC patients.¹⁹

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), key elements in the tumor-specific cellular adaptive immune response, may exert opposite effects in antitumor defense.³ Thus, CD8 + cytotoxic T cells have been positively correlated with a favorable prognosis in PC patients^{23,25}; however, it has also been observed that part of the T-cell population, including certain CD8 + T cells, may contribute to an unfavorable prognosis in PC, depending on the factors that they secrete.²⁴ Tumor-infiltrating CD4 + T cells may also have contrasting effects on PC development. T helper-1 (Th1) cells have been related to antitumor features, whereas T helper-2 (Th2) cells seem to promote tumor development and have been associated with reduced survival in PC patients.^{17,26,27} T-regulatory cells (Tregs) block the adaptive immune response, contributing to immune evasion, and leading to a poor prognosis,^{28,29} and this population increases during tumor progression.^{19,30} T helper-17 (Th17) subtype exerts both protumor and anti-tumor effects in different cancer types¹⁹ and has been found to play both a protective and protumor role in PC, although all authors have emphasized the lack of certainty on this issue.^{29,31,32}

Other types of infiltrating immune cell have also exhibited opposite effects in PC.¹⁹ Dendritic cells (DCs) mediate the action of tumor-specific effector T cells and have been correlated with a favorable prognosis,³³ but their function was reported to be adversely affected by the immunosuppressive tumor environment.¹⁷ Moreover, DCs have been observed to produce a shift from the Th1 to Th2 subtype, hampering antitumor immune responses and illustrating their dual role.³⁴ Natural killer (NK) cells are involved in the recognition and elimination process of tumor cells³⁵ and have been

correlated with a better prognosis,³⁶ but PC cells can escape the immune control of NK cells by suppressing their antitumor properties.¹⁷ Finally, myeloid-derived suppressor cells contribute to tumor development and invasion¹⁹ by suppressing innate and adaptive immunity³⁷ and promoting the immunosuppressive environment,^{17,19} and they have been correlated with a poor prognosis in PC.³⁸

Tumor-associated macrophages are among the infiltrating cell populations related to inflammatory processes in cancer, but tumor-associated macrophage subtypes differ in their effect on tumor development. Thus, the M1 subtype has been attributed with antitumor properties, whereas the M2 phenotype suppresses specific immune responses³⁹ and exerts protumor effects, and it has been related to a poor prognosis in PC patients.⁴⁰

Considerable research efforts are focused on the development of immunotherapeutic treatments based on immune activation and/or the elimination of immune suppression mechanisms, to enhance the anticancer immune response and avoid immune evasion.^{23,41,42}

Immunotherapy can be classified as passive or active according to its influence on the host immune system.⁴³ In passive or adoptive immunotherapy, the patient is administered with a cell type or compound (eg, activated T lymphocytes or macrophages, monoclonal antibodies, or cytokines) to initiate antitumor action.⁴⁴⁻⁴⁶ In general, these therapies do not generate immunologic memory, and their effect is lost once the therapy ends.⁴⁴ In contrast, active or adaptive immunotherapy is based on the patient's own cells, triggering an antitumor immune response, and 1 example of this approach is anticancer vaccines.^{43,45} Given that the patient's immune cells are directly involved, immunologic memory can be developed and the effect may persist after cessation of the treatment.⁴⁴ Both approaches can be either specific or nonspecific.⁴⁷

The advantage of immunity mediated by antigen-specific cells is that they specifically target tumor cells, improving the anticancer response. However, antigen-specific effector T cells upregulate immunosuppressive molecules (eg, PD-1 and CTLA-4) and may help to promote the immunosuppressive environment generated by the tumor.^{3,41} Furthermore, the identification of good target antigens is a difficult task and one of the major limitations of antigen-specific immunotherapy.¹⁷ In addition, given the immunosuppressive tumor microenvironment, this type of immunotherapy may encounter several obstacles that may, eventually, permit immune evasion. However, antigen-nonspecific so-called immunomodulatory strategies can support antigen-

nonspecific immunity and produce a broader response, involving various innate and adaptive immune cell types that do not suffer suppression through PD-1 or CTLA-4 overexpression.⁴¹

Given the modulatory effect of nonspecific treatments, some authors have suggested that the combination of antigen-specific and nonspecific immunotherapies may yield a clinical benefit.³ Nonspecific immunotherapy reduces the immunosuppressive microenvironment of PC and induces the action of antigen-nonspecific T cells and innate immunity cells, whereas specific immunotherapy is more effective in developing the antigen-specific immune response. Hence, immunotherapy seems to be an attractive option for PC treatment, given the high resistance to chemotherapy and the important dual role of the immune response during the course of the disease.

PASSIVE IMMUNOTHERAPY

Monoclonal Antibodies

Taking advantage of the ability of antibodies to bind to specific antigens, many researchers have focused on designing monoclonal antibodies that bind to tumor-specific antigens.⁴⁸ The anticancer action of monoclonal antibodies may derive from an immune response against the tumor,⁴⁹ either through effects on their target proteins or through selective eradication of tumor cells in conjunction with different cytotoxic substances.⁵⁰ Because of their high specificity for binding to their targets and their ability to directly or indirectly inhibit tumor progression, monoclonal antibodies have been proposed as a promising alternative therapy for PC.⁵¹ In fact, numerous clinical trials involving monoclonal antibodies and PC patients are under way (Table 1).

The first monoclonal antibody that the US Food and Drug Administration approved for cancer therapy was rituximab (anti-CD20, B-cell surface antigen), which was indicated for the treatment of B-cell non-Hodgkin lymphoma or chronic lymphocytic leukemia.^{52,53} Since then, many monoclonal antibody-based therapies have been approved for clinical use in different types of cancer, including cetuximab and panitumumab [anti-human epidermal growth factor receptor (EGFR)] for the treatment of KRAS wild-type colorectal cancers^{54,55} and trastuzumab [anti-human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)] for the treatment of HER2-positive early-stage and metastatic breast cancer.⁵⁶ Some of these approved monoclonal antibodies have been tested in PC patients, but the results have been disappointing.⁵⁷

Most pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients exhibit upregulated EGFR,⁵¹ which suggested that cetuximab may be useful against this malignancy. However, although its combination with gemcitabine showed improvements in PDAC patients versus gemcitabine alone in a phase II clinical trial,⁵⁸ it offered no advantage in overall survival (OS) (6.3 vs. 5.9 mo, respectively) in the subsequent phase III trial, in which 745 advanced or metastatic PDAC patients were enrolled.⁵⁹ This failure may be attributable to the mutation of the KRAS gene in 90% of PDAC patients.^{60,61} In another phase II trial,⁵⁶ patients with locally advanced or metastatic PC received an anti-EGFR monoclonal antibody plus nimotuzumab monotherapy, obtaining a median OS of only 18.1 weeks.⁶² A study in which 18 patients with unresectable locally advanced or metastatic PDAC were treated with nimotuzumab plus gemcitabine reported a median OS of 9.29 months and 1-year survival rate of 38.9%.⁶³ Bevacizumab, another approved monoclonal antibody, targets the vascular endothelial growth factor and is indicated for the treatment of colorectal, lung, and breast cancers, among others.⁶⁴ A phase II trial in 52 advanced PDAC patients found no significant improvement in outcomes with the administration of bevacizumab after gemcitabine treatment in comparison with gemcitabine alone.⁶⁵ Likewise, a phase III study in 535 advanced PC patients observed no significant difference in OS between treatment with gemcitabine plus bevacizumab (5.8 mo) and gemcitabine plus placebo (5.9 mo).⁶⁶

The monoclonal antibody ganitumab targets the insulin-like growth factor 1 receptor, which is upregulated in PDAC, leading to cell proliferation and invasion and apoptosis inhibition.^{67,68} Ganitumab was tested in PDAC patients in combination with gemcitabine, and improved OS outcomes were recorded in the phase I and II trials,^{69,70} but the phase III trial was prematurely halted due to the absence of any significant improvement.⁷¹

Numerous monoclonal antibody therapies have been tested against PC but have failed to demonstrate clinical efficacy. In the ongoing search for monoclonal antibodies against this malignancy, more specific molecular targets are being considered, and immune checkpoints are of particular interest in this regard.

One of the main characteristics of pancreatic tumors is a desmoplastic reaction,⁷² which creates a favorable tumor microenvironment that stimulates proliferation, treatment resistance, and immune evasion.⁷³ In this regard, immune checkpoints, also known as coinhibitory and costimulatory molecules of T cells, regulate the survival, proliferation, and response to antigens of these cells.⁷⁴ For this reason, these checkpoints have emerged as potential targets for immunotherapy.

T-cell activation requires the recognition of antigenic fragments bound to the surface of antigen-presenting cells (APCs) by T-cell antigen receptors (TCRs),⁷⁵ and these remain inactivated without these costimulatory signals. The activation process is regulated by the interaction of costimulatory receptors on the T-cell surface with their ligands on APCs.⁷⁶ The CD28 receptor ligands of T cells, B7-1 and B7-2, are critical costimulatory molecules for their activation,⁷⁷ although they can also generate a coinhibitory signal,⁷⁸ as discussed below.

T-cell activation is prevented by the presence of coinhibitory molecules. The most widely studied coinhibitory immune checkpoint molecules are CTLA-4⁷⁹ and PD-1,^{80,81} which are being evaluated in several clinical trials (Table 1). The coinhibitory molecule CTLA-4 is expressed by activated T cells⁸² and shares with the costimulatory molecule CD28 the B7-1 and B7-2 ligands, for which they compete, although CTLA-4 has higher affinity for both.⁸³ As already mentioned, B7-1 and B7-2 ligands function as costimulatory molecules when they interact with the CD28 receptor, but they can behave as coinhibitory molecules when they interact with CTLA-4. Many preclinical cancer models have pointed to the importance of CTLA-4 in the antitumor immune response, suggesting that blockade of this pathway may improve the survival of cancer patients.⁸² Ipilimumab is a monoclonal antibody that blocks the CTLA-4 receptor.⁷⁴ On the basis of its improvement of outcomes in metastatic melanoma,⁸⁴ monotherapy with ipilimumab was tested in a phase II trial with 27 advanced PDAC patients but demonstrated low efficacy.⁸⁵ Interestingly, authors reported 1 patient who showed a significantly delayed regression of the disease, suggesting the potential importance of immune checkpoint blockade in PDAC. A phase Ib trial reported a significantly increased OS in patients treated with ipilimumab plus active immunotherapy [granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-based whole-cell vaccine (GVAX)] in comparison with ipilimumab alone (12-mo OS of 27% vs. 7% and median OS of 5.7 vs. 3.6 mo, respectively).⁸⁶ The anti-tumor effect of ipilimumab has been evaluated as a single therapeutic agent and in combination with vaccines and chemotherapeutic/immunotherapeutic agents, and durable partial and complete responses have been reported.⁸⁷ Tremelimumab, another monoclonal antibody against CTLA-4, was found to modulate the immune system of metastatic melanoma patients, leading to a durable anti-tumor immune response.⁸⁸ Taken together, the above data support the clinical potential of antitumor therapy with CTLA-4 blockade.

PD-1 is another coinhibitory molecule, comparable with CTLA-4.⁸⁹ It binds to B7 family ligands on APC surfaces, including programmed death ligand-1 (PD-L1 or B7-H1) and

programmed death ligand-2 (PD-L2 or B7-DCs),⁷⁴ negatively regulating the immune response.⁹⁰

Different immune cells express PD-1, including activated T and B cells, myeloid cells,^{80,91,92} and TILs, suggesting a critical role in controlling the intratumor effector T-cell response.⁸² For their part, the expression profiles of PD-L1 and PD-L2 ligands differ, with PD-L1 ligands being more widely expressed.⁹³ Thus, PD-L1 is expressed by resting and activated T cells, B cells, macrophages, DCs, mast cells, and nonhematopoietic cells, among others, whereas PD-L2 is only expressed by activated macrophages, myeloid DCs, and mast cells, exhibiting a more limited distribution.⁸² Moreover, PD-L1 is expressed in melanoma, renal, and gastric tumors, among others⁹⁴ and has been correlated with a poor prognosis in several cancers,⁹⁵ including PC.^{95,96} Blockade of the PD-L1/PD-1 pathway has demonstrated antitumor action in PC⁹⁵ and has attracted major research interest as a therapeutic target.

One of the main advantages of PD-1 versus CTLA-4 blockade is the lower toxicity of the former, probably attributable to the high expression of PD-L1 ligand in almost all types of cancer, including PC, whereas CTLA-4 ligands are expressed on APCs.⁹⁵

The effect of increasing doses of anti-PD-L1 antibody (BMS-936559, MDX-1105) was evaluated in a phase I trial in patients with different advanced cancers, including 14 PC patients, but OS outcomes have not been reported for the latter.⁹⁷ Other examples of monoclonal antibodies developed against PD-1 include pembrolizumab (MK-3475, lambrolizumab) and nivolumab (BMS-936558 or MDX1106), which were found to be useful in treating various cancers.^{48,98} Another anti-PD-L1 antibody, pidilizumab (CT-011), is undergoing testing in combination with gemcitabine for PC treatment (ClinicalTrials.gov Identifier NCT01313416).

T-Cell-based Adoptive Cell Transfer (ACT)

ACT-based immunotherapy involves collection from the host of T lymphocytes with demonstrated antitumor activity, followed by their ex vivo culture and stimulation before readministration to the patient.^{99,100} There are 2 main types of adoptive immunotherapy according to the type of T cell used. In one type, TILs from the tumor are expanded, activated, and reinfused into the patient. In the other type, isolated peripheral T cells that express certain receptors are stimulated or engineered before their readministration.¹⁰¹ These receptors can include cancer-specific TCRs or receptors generated by combining the extracellular portion of an antibody with the T-cell receptor's signaling machinery, named chimeric antigen receptors (CARs).^{100,101} The

ACT approach was also found to achieve an improved and more durable immune response after lymphodepletion pretreatment.^{102,103}

Various studies have reported the important role of certain TIL populations in both tumor development and treatment,¹⁰⁴ and their presence has been associated with an improved OS in different cancers,^{105,106} including PDAC.²⁵ Trials have been conducted on the expansion and readministration of TILs from patients with melanoma^{107,108} and head and neck squamous cell carcinoma.¹⁰⁹ The harvesting of TILs is an invasive and complicated procedure.¹⁰⁰ Furthermore, the ex vivo expansion of TILs requires exposure to IL-2,¹⁰² and prolonged therapy with this growth factor leads to significant levels of toxicity.¹⁰⁰

The capability to harvest tumor-reactive TILs is related to the immunogenic nature of the cancer¹¹⁰ and is more feasible in tumors such as melanoma¹⁰⁸ than in other less immunogenic tumors such as gastrointestinal cancers.¹¹⁰ Consequently, their isolation and culture in sufficient quantities are difficult,¹¹¹ and approaches have been developed utilizing peripheral T cells to overcome these limitations of TIL-based ACT.

The most widely studied immune cell type for ACT is the cytokine-induced killer (CIK) cell, which has been tested in non-small cell lung, gastric, renal, and colorectal cancers, among others.^{112–114} One advanced PC patient who received treatment based on CIK transfer had a progression-free survival of >19 months.¹¹⁵ A recent phase II study tested a CIK-based ACT treatment with gemcitabine in 20 advanced PC patients, expanding the cells ex vivo with anti-CD3 monoclonal antibody and IL-2 before their readministration, obtaining a median progression-free survival of 11.0 weeks and median OS of 26.6 weeks.¹¹⁶ However, the clinical out-comes obtained with this therapy were reported to be poor,¹¹⁷ probably due to the lack of specificity.¹¹⁸

Other strategies have been adopted to make peripheral T cells more reactive to the tumor. In a clinical study by Kawaoka et al,¹¹⁹ peripheral T cells from PC patients were exposed to YPK-1, a human PC cell line that expresses mucin-1 (MUC1), which is an upregulated TAA in PDAC,¹²⁰ and the exposed T cells were then reinfused into patients. The median survival was 5 months in unresectable cases and 17.8 months in resectable ones. One-, 2-, and 5-year survival rates for the patients with resectable cancer were 83.3%, 32.4%, and 19.4%, respectively. In another study, the same research group reinfused MUC1-stimulated (YK-exposed) T cells and DCs pulsed with MUC1 peptide in 20 unresectable or recurrent PC patients, reporting a median survival time of 9.8 months (range, 2 to 75 mo). Strikingly, a complete response was observed

in 1 patient with multiple lung metastases after curative surgery, suggesting that the addition of pulsed DCs may improve the clinical outcome.¹²¹

In addition, different genetic engineering approaches have recently emerged. Thus, genes encoding TCRs specific to tumor antigens have been transferred into T cells (TCR-engineered T cells), providing the patients with reactive cells.¹²² Application of this strategy in melanoma and synovial cell sarcoma patients achieved 3-year survival rates of 33% and 38%, respectively.¹²³ In another technique, T cells from the patient are genetically engineered to express CARs specific to a tumor antigen.¹²⁴ These receptors are transmembrane proteins and, as noted above, they comprise an extracellular domain consisting of single-chain variable fragments derived from antibodies, which is specific for a tumor antigen and linked to intracellular signaling domains through a hinge and transmembrane regions.¹¹¹ One advantage of CAR-engineered T cells is that they recognize the native tumor antigen and therefore avoid dependence on MHC I, which is often downregulated in many tumors.¹²⁴ Several specific CARs have been developed for different tumor antigens, such as mesothelin,¹²⁵ CEA,¹²⁶ and MUC1,¹²⁷ among others.¹²⁴ In a recent study, administration of mesothelin-specific mRNA CAR-engineered T cells to patients with mesothelin-expressing solid tumors induced an antitumor immune response in 2 patients with progressive disease, including 1 PDAC patient.¹²⁸ Numerous ongoing clinical trials are currently evaluating the use of different types of ACT-based immunotherapy (Table 1).

TABLE 1. Summary of Major Ongoing Clinical Trials Involving Immunotherapeutic Treatment in Patients With Pancreatic Cancer (Initiated in 2015)

ClinicalTrials.gov Identifier	Phase	Tumor type	Study agents (*)	Estimated enrollment	Study status	First received date †	Estimated Primary Completion Date ‡
NCT02620865	I/II	Locally advanced or metastatic pancreatic cancer	anti-CD3 x anti-EGFR-BATs + standard chemotherapy + aldesleukin (IL-2) + sargramostim (GM-CSF)	43	Not yet recruiting	December 2015	December 2016
NCT02620423	I	Pancreatic adenocarcinoma	Pelareorep (Reovirus targeted cells with activating Ras pathway mutations) + chemotherapy (gemcitabine or irinotecan or leucovorin/ 5-FU) + pembrolizumab (anti-PD-1 mAb)	9	Not yet recruiting	November 2015	December 2016
NCT02602067	I	Tenascin-C+ cancer (including NHL, breast, head and neck, skin, respiratory tract, urogenital, digestive system, pancreatic, connective and soft tissue neoplasms)	131I-labeled Tenatumomab (anti-Tenascin-C mAb)	36	Active, not recruiting	November 2015	June 2017
NCT02600949	I	Advanced PDAC or colorectal adenocarcinoma	Personalized peptide vaccine	40	Not yet recruiting	November 2015	March 2021

NCT02587689	I/II	MUC1+ advanced refractory solid tumor (including NSCLC, HCC, pancreatic and triple-negative invasive breast carcinoma)	anti-MUC1-CAR-T Cells	20	Recruiting participants	October 2015	October 2017
NCT02583477	I/II	Metastatic PDAC	MEDI4736 (anti-PD-L1 mAb) + nab-paclitaxel + gemcitabine	26	Not yet recruiting	October 2015	May 2017
			MEDI4736 (anti-PD-L1 mAb) + AZD5069 (CXCR2 antagonist)				
NCT02580747	I	Relapsed and/or chemotherapy refractory malignancies (including malignant mesothelioma, pancreatic, ovarian, triple negative breast and endometrial cancer, and other mesothelin positive tumors)	anti-meso-CAR-T cells	20	Recruiting participants	October 2015	November 2017
NCT02559674	I/II	Advanced pancreatic cancer	ALT-803 (IL-15 superagonist) + gemcitabine and nab-paclitaxel	66	Not yet recruiting	September 2015	October 2018
NCT02548169	I	Pancreatic cancer	DC vaccine + chemotherapy (FOLFIRINOX and gemcitabine + nab-paclitaxel)	20	Recruiting participants	September 2015	April 2017
NCT02541370	I	Relapsed and/or chemotherapy refractory malignancies (including liver, pancreatic, brain, breast, ovarian and colorectal cancer, acute myeloid and lymphoid leukemias)	anti-CD133-CAR-T cells	20	Recruiting participants	September 2015	October 2017

NCT02558894	II	Metastatic PDAC	MEDI4736 (anti-PD-L1 mAb)	130	Recruiting participants	August 2015	February 2018
			Tremelimumab (anti-CTLA4 mAb) + MEDI4736 (anti-PD-L1 mAb)				
NCT02529579	I/II	PDAC	Gemcitabine	187	Recruiting participants	August 2015	December 2018
			iAPA-DC/CTL (cellular immunotherapy) + gemcitabine				
NCT02546531	I	Advanced pancreatic cancer	Defactinib (VS-6063) (FAK inhibitor) + pembrolizumab (anti-PD-1 mAb) + gemcitabine	50	Not yet recruiting	August 2015	June 2018
NCT02527434	II	Advanced solid tumors (including PDAC, urothelial bladder and triple-negative breast cancer)	Tremelimumab (anti-CTLA4 mAb)	96	Recruiting participants	August 2015	May 2018
			MEDI4736 (anti-PD-L1 mAb)				
			MEDI4736 (anti-PD-L1 mAb) + tremelimumab (anti-CTLA4 mAb)				
NCT02498665	I	Advanced malignancies (acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, glioblastoma multiforme, melanoma, sarcoma, RCC, NSCLC, ovarian, pancreatic cancer)	DSP-7888 (WT1 protein-derived peptide vaccine)	60	Recruiting participants	July 2015	November 2017
NCT02465983	I	Metastatic pancreatic cancer	meso-CAR-T cells + CD19-CAR-T cells + CY	12	Recruiting participants	May 2015	July 2016

NCT02452424	I/II	Advanced melanoma and other solid tumors (including, PDAC, HNSCC, NSCLC, ovarian, triple-negative breast, bladder and gastric cancer)	PLX3397 (inhibitor multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor) + pembrolizumab (anti-PD-1 mAb)	400	Recruiting participants	May 2015	May 2015
NCT02451982	I/II	Resectable pancreatic adenocarcinoma	CY + GVAX vaccine (cell vaccine)	50	Not yet recruiting	May 2015	February 2018
			CY + GVAX vaccine (cell vaccine) + nivolumab (anti-PD-1 mAb)				
NCT02432963	I	Solid tumors	p53MVA+ pembrolizumab (anti-PD-1 mAb)	12	Recruiting participants	April 2015	November 2016
NCT02431260	I/II	Advanced cancer	INCB054329 (BET proteins inhibitor)	155	Recruiting participants	April 2015	October 2017
NCT02446093	I/II	Advanced non-metastatic pancreatic adenocarcinoma	GMCI (by vaccine based on AdV-tk) + FOLFIRINOX + gemcitabine + radiation + surgery	44	Recruiting participants	April 2015	December 2017
			FOLFIRINOX + gemcitabine + radiation + surgery				
NCT02416466	I	CEA+ adenocarcinoma and liver metastases	anti-CEA-CAR-T cells + Sir-Spheres (medical device used in SIRT)	6	Recruiting participants	March 2015	March 2016
NCT02405585	II	Borderline resectable pancreatic cancer	FOLFIRINOX + algenpantucel-L (cell-based vaccine)	48	Recruiting participants	March 2015	December 2016
NCT02362048	II	Advanced or metastatic pancreatic cancer	ACP-196 (BTK inhibitor)	76	Active, not recruiting	January 2015	May 2017
			ACP-196 + pembrolizumab (anti-PD-1 mAb)				

NCT02349724	I	CEA+ cancer (including gastric, lung, pancreatic, breast and colorectal cancer)	Anti-CEA-CAR-T cells	75	Recruiting participants	January 2015	December 2018
NCT02331251	I/II	Advanced cancer (including breast, pancreatic and ovarian cancer, sarcoma and SCLC)	Pembrolizumab (anti-PD-1 mAb) + chemotherapy (gemcitabine and nab-paclitaxel)	90	Recruiting participants	January 2015	December 2015

*In trials involving several tumor types the table shows study agents for pancreatic cancer.

†Date that summary clinical study protocol information was first submitted to the ClinicalTrials.gov registry.

‡Final data collection date for primary outcome measure.

5-FU indicates 5-fluorouracil; AdV-tk, adenoviral vector containing the Herpes Simplex thymidine kinase gene; BATs, bispecific antibody armed activated T cells; BET, bromodomain and extra terminal; BTK, Bruton’s tyrosine kinase; CAR, chimeric antigen receptor; CD133, prominin-1; CD19, differentiation antigen CD19; CD3, cluster of differentiation 3; CEA, carcinoembryonic antigen; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; CTLs, cytotoxic T lymphocytes; CXCR2, cysteine-X-cysteine chemokine receptor-2; CY, cyclophosphamide; DC, dendritic cells; EGFR, epidermal growth factor receptor; FAK, focal adhesion kinase; GMCI, gene-mediated cytotoxic immunotherapy; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HCC, hepatocellular carcinoma; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; iAPA, inhibitory effect of antigen presentation attenuators; IL-15, interleukin 15; IL-2, interleukin 2; mAb, monoclonal antibody; meso, mesothelin; MUC1, mucin-1; NHL, non-Hodgkin lymphoma; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; p53MVA, modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing p53; PD-1, programmed cell death protein 1; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; PD-L1, programmed death ligand-1; RCC, renal cell carcinoma; SCLC, small cell lung cancer; SIRT, selective internal radiation therapy; WT1, Wilms tumor 1.

ACTIVE IMMUNOTHERAPY

One type of active immunotherapy is vaccination, which is designed to induce or enhance the antitumor response *in vivo*, activating and expanding tumor-specific T cells.¹⁷ It involves the administration of single or multiple tumor antigens to stimulate a tumor-specific immune response.¹²⁹ Anticancer vaccines can be classified in 2 categories: (1) preventive or prophylactic vaccines, which aim to prevent cancer, and (2) therapeutic vaccines, applied to treat an existing cancer.¹³⁰ Antitumor vaccine-based therapy is an extensive field that has been widely described in recent reviews.^{131,132} We describe here the most important clinical studies involving PC patients. Table 1 lists numerous ongoing clinical trials on therapeutic vaccines in general.

Two preventive anticancer vaccines have been approved for clinical use. One is the hepatitis B virus vaccine, designed to prevent hepatocellular carcinoma by avoiding chronic hepatitis B infection, which increases the risk of this type of cancer.¹³³ The other preventive vaccine, the well-known human papillomavirus vaccine, was approved in 2006 for use against cervical cancer.¹³⁴ Preventive vaccines are an attractive approach in anticancer therapy, and numerous clinical trials are under way. Nevertheless, preventive vaccines for most cancers, including PC, are still far from being a clinical reality.

The goal of therapeutic vaccines is to induce the patient's own immune cells to attack the tumor cells.¹³⁵ These vaccines can also initiate a durable immune response against the tumor, improving survival outcomes.^{136,137} Therapeutic vaccines can be classified into different groups: cell-based, protein/peptide-based, and genetic vaccines.^{57,138}

Cell-based Vaccines

These vaccines can include tumor or immune cell-based preparations. Tumor cell-based vaccines can be either autologous or allogeneic.¹³⁵ The development of autologous vaccines takes advantage of the antigenic repertoire of tumor cells. However, this approach is complex, involving the generation of personalized vaccines for each patient.¹³⁹ Allogeneic vaccines may overcome these limitations and can be produced on a large scale.¹³⁸

Algenpantucel-L is a vaccine against PC that consists of 2 irradiated human PC cell lines (HAPa-1 and HAPa-2), which are genetically modified to express the murine enzyme α -1,3-galactosyl transferase (α -GT).¹⁴⁰ Although this enzyme is not found in

humans,¹⁴¹ antibodies against it are present¹⁴²; therefore, interaction between the antibody and its ligand ultimately leads to the destruction of α -GT-expressing cells.¹⁴⁰ A phase II study in 73 PC patients who had undergone R0/R1 resection treated them with algenpantucel-L in combination with gemcitabine and 5-fluorouracil-based therapy, obtaining a 1-year disease-free survival (DFS) of 62% and 1-year OS of 86%, with a median follow-up of 21 months.¹⁴³ On the basis of these results, 2 phase III clinical trials are evaluating this vaccine in resected PC patients (ClinicalTrials.gov identifier NCT01072981) and in borderline resectable or unresectable locally advanced PC patients (ClinicalTrials.gov identifier NCT01836432).

Another cell-based vaccine tested in PC patients is based on irradiated cells modified to express GM-CSF.⁵⁷ These types of vaccine are known as GAVX vaccines and have been studied in several tumor types.¹⁴⁴ A phase II study administered GAVX vaccine with 5-fluorouracil-based chemoradiotherapy in 60 resected PDAC patients and obtained a median OS of 24.8 months and median DFS of 17.3 months, observing a 1-year OS in 85% of the patients and 1-year DFS in 67.4%.¹⁴⁵ GVAX vaccines are being tested in several trials (Table 1), including a pilot study of GVAX vaccine with FOLFIRINOX and radiation-based treatment in resected PC patients (ClinicalTrials.gov identifier NCT01595321).

Among immune cell-based vaccines, DCs have attracted major interest due to their critical role in the immune response.¹³⁹ In general terms, cell-based vaccines consist of cells that are isolated from the patient, antigen loaded, and activated ex vivo, and are then readministered to the patient.^{146,147} The use of vaccines based on peptide/protein-pulsed DCs or infected with viral vectors has been studied in several tumor types.^{148,149} Sipuleucel-T is the only therapeutic anticancer vaccine approved for clinical use, and it is recommended for the treatment of PC.¹⁵⁰

In a phase I pilot study, 10 locally advanced or metastatic PC patients received Wilms tumor 1 (WT1) peptide-pulsed DC vaccine combined with gemcitabine.¹⁵¹ WT1 encodes a zinc finger DNA-binding protein¹⁵² involved in tumorigenesis, and its expression has been reported in numerous solid tumors, including PC.¹⁵³ A median OS of 243 days and disease control rate of 60% were recorded in these patients, but the survival rate was significantly better in patients with stable versus progressive disease. Hence, this vaccine may be effective for inducing antitumor T-cell responses in PC patients with nonliver metastases and favorable immunologic data.¹⁵¹ In another study, a vaccine composed of autologous DCs pulsed with MUC1 peptide was administered to 7 advanced PC patients, but only 2 of them evidenced a significant immune

response.¹⁵⁴ In a recent phase I/II clinical trial, PC patients were treated with cancer stem cell–loaded DC vaccines, whose production involves the generation of DCs from autologous peripheral mononuclear cells and the isolation of cancer stem cells from tumor tissue.¹⁵⁵ According to the results obtained, the vaccine activated Th1 immune pathways and increased the amount of NK and T cells; however, as acknowledged by the authors, further research is needed to establish the impact of this treatment on survival outcomes.

DCs are not the only APCs under investigation for the development of therapeutic antitumor vaccines. In a pilot trial, 7 PC patients received a vaccine based on an autologous lymphoblastoid cell line modified to express a mutated Ras-protein.¹⁵⁶ Six of the 7 patients showed a specific T-cell response, and the disease was stabilized in 4 of the patients but only during a 4-month period.

Protein/Peptide-based Vaccines

Peptide vaccines are generally based on TAAs that can induce a specific immune response.¹³⁵ They have been considered less promising⁵⁷ because the presentation of peptide antigens by APCs differs from that by whole cells, and because these vaccines target only one or a few epitopes of TAAs.¹³⁸ Nevertheless, there have been several studies on this approach. In 1 investigation, a vaccine against mutated KRAS was administered to 24 resectable PDAC patients, but no significant relationship was observed between the response and the clinical outcome.¹⁵⁷ In a phase II trial, a personalized peptide vaccine was administered to advanced PDAC patients in combination with gemcitabine, obtaining a median OS of 7.9 months and 1-year OS of 26.8%.¹⁵⁸

A phase I/II study in 48 unresectable PC patients tested 3 doses of GV1001, a peptide vaccine that targets the human telomerase reverse transcriptase subunit.¹⁵⁹ The immunogenic response was associated with improved survival, which was longest in the intermediate dose group (8.6 mo). A recent phase III clinical trial tested GV1001 vaccine combined with a standard regimen of gemcitabine and capecitabine in 1062 patients with locally advanced or metastatic PC, finding no improvement in OS.¹⁶⁰

Nishida et al¹⁶¹ conducted a phase I clinical study in 32 advanced PC patients, who were treated with a combination of gemcitabine and WT1 peptide-based vaccine. An association was observed between a specific immune response to WT1 and an improved clinical outcome, obtaining survival times of 12 months or longer.

Several studies have evaluated peptide-based immunotherapy using kinesin family member 20A (KIF20A)-66, an epitope peptide for KIF20A. The KIF20A peptide is involved in the trafficking of molecules during tumor growth.¹⁶² In a phase I study, 9 advanced PC patients were treated with KIF20A-derived peptide in combination with gemcitabine, but no associations were found among peptide dose, antigen-specific T-cell response, or clinical outcome.¹⁶³ In a phase I/II clinical trial, KIF20A-66 peptide vaccine was administered to 31 patients with advanced PC, and the outcomes were compared with those of a historic cohort, finding a significantly longer OS in the vaccine-treated patients (142 vs. 83 d), with 1 case of a complete response.¹⁶⁴

Genetic Vaccines

Genetic vaccines comprise DNA-based, RNA-based, and viral-based vaccines that can be transfected to somatic cells or DCs, inducing them to express TAAs and generating an immune response.¹³⁵ These vaccines can activate different types of immunity by delivering multiple antigens in a single administration.¹⁶⁵ Furthermore, RNA-based vaccines are associated with reduced adverse effects due to their rapid degradation.¹³⁵

There have been several studies on genetic vaccines, but the results have been unsatisfactory,^{166–168} and research is under way to improve their effectiveness.^{135,138} In a recent phase I study, a p53-expressing modified vaccinia Ankara (MVA-p53 vaccine) was administered to patients with p53-overexpressing solid tumors, including PC patients (ClinicalTrials.gov identifier NCT01191684). Two dose levels were used to test the safety and tolerability of the vaccine. MVA-p53 vaccine was found to be well tolerated, with grade 1-2 toxicity. In addition, the disease was stabilized in 1 PC patient. The authors called for further research on the immunogenicity of this vaccine in wider samples.¹⁶⁹ A very recent phase I/II study has been completed in 20 patients with pancreatic neoplasms, involving the administration of standard therapy with a mix of several vaccines [including DPT (diphtheria, pertussis, and tetanus), typhoid, *Staphylococcus aureus*, and paratyphoid A and B]. However, the results of this study have not yet been posted (Clinical-Trials.gov identifier NCT02338752).

CONCLUSIONS

Despite improved understanding of the genetic events underlying PC, current treatments for this malignancy remain limited, with poor clinical outcomes.^{13,14} The desmoplastic reaction and the immunosuppressive environment surrounding pancreatic tumors seem to be among the main obstacles to the successful treatment of this lethal disease.⁷² It is therefore necessary to identify specific targets in PC for the

design of therapies that achieve a more effective antitumor response. Advances in knowledge of the mechanisms of activation and/or immune suppression orchestrated in PC have led to the development of immunotherapy as a promising approach.^{23,24} Different clinical studies have demonstrated the therapeutic potential of combining traditional PC treatments with several types of immunotherapy,^{86,121} and there is considerable evidence that the combination of chemotherapy and immunotherapy may be a good option in cancer treatment.^{143,145,170} Likewise, limitations in the separate administration of specific and nonspecific immunotherapies have suggested that their combination may be a good therapeutic strategy in PC, considering their possible reciprocal positive effects.²³ This approach has also been proposed in conjunction with standard chemotherapy.¹⁷⁰ In this regard, given the heterogeneity of PC and the different clinical outcomes obtained using the same therapy, it is essential to establish biomarkers to predict clinical responses and to identify molecular targets in individual patients that may improve outcomes. In summary, immunotherapy opens up a new therapeutic panorama for the treatment of cancer. The number of clinical trials in PC patients is expected to increase in the coming years, supporting the development of personalized immunotherapy.

REFERENCES

1. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 1984;44:4217–4223.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646–674.
3. Panizza A, Merkow J, Edil BH, et al. Immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma: an overview of clinical trials. *Chin J Cancer Res.* 2015;27:376–391.
4. Ehrlich P, Ueber Den Jetzigen. Stand Der Karzinomforschung [The current state of cancer research]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1909;5:73–290.
5. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J.* 1957;1:779–786.
6. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006;6: 836–848.
7. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3:991–998.

8. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18:11–18.
9. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21:137–148.
10. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331:1565–1570.
11. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007;117:1137–1146.
12. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007;450:903–907.
13. Burris HA III, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 1997;15:2403–2413.
14. Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, et al. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol.* 2002;20:3270–3275.
15. Di Marco M, Di Cicilia R, Macchini M, et al. Metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the best standard treatment? (Review). *Oncol Rep.* 2010;23:1183–1192.
16. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al. Folfirinox versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011;364:1817–1825.
17. Amedei A, Niccolai E, Prisco D. Pancreatic cancer: role of the immune system in cancer progression and vaccine-based immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10:3354–3368.
18. Gajewski TF. Cancer immunotherapy. *Mol Oncol.* 2012;6: 242–250.
19. Wormann SM, Diakopoulos KN, Lesina M, et al. The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene.* 2014;33:2956–2967.

20. Lucas S, Coulie PG. About human tumor antigens to be used in immunotherapy. *Semin Immunol.* 2008;20:301–307.
21. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2014;14:135–146.
22. Gao J, Bernatchez C, Sharma P, et al. Advances in the development of cancer immunotherapies. *Trends Immunol.* 2013;34:90–98.
23. Bazhin AV, Shevchenko I, Umansky V, et al. Two immune faces of pancreatic adenocarcinoma: possible implication for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63:59–65.
24. Niccolai E, Taddei A, Ricci F, et al. Intra-tumoral IFN-gamma-producing Th22 cells correlate with TNM staging and the worst outcomes in pancreatic cancer. *Clin Sci (Lond).* 2016;130:247–258.
25. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, et al. Cd8 + tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4 + tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 2004;28:e26–e31.
26. De Monte L, Reni M, Tassi E, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 2011;208:469–478.
27. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:298–306.
28. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10: 942–949.
29. Amedei A, Niccolai E, Benaglio M, et al. Ex vivo analysis of pancreatic cancer-infiltrating T lymphocytes reveals that eno-specific Tregs accumulate in tumor tissue and inhibit Th1/ Th17 effector cell functions. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62:1249–1260.

30. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, et al. Prevalence of Foxp3 + regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5423–5434.
31. He S, Fei M, Wu Y, et al. Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2011;12:7424–7437.
32. Vizio B, Novarino A, Giacobino A, et al. Potential plasticity of T regulatory cells in pancreatic carcinoma in relation to disease progression and outcome. *Exp Ther Med.* 2012;4:70–78.
33. Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, et al. Circulating myeloid dendritic cells as prognostic factors in patients with pancreatic cancer who have undergone surgical resection. *J Surg Res.* 2012;173:299–308.
34. Yang M, Ma C, Liu S, et al. HIF-dependent induction of adenosine receptor A2b skews human dendritic cells to a Th2-stimulating phenotype under hypoxia. *Immunol Cell Biol.* 2010;88:165–171.
35. Kunk PR, Bauer TW, Slingluff CL, et al. From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2016;4:14
36. Davis M, Conlon K, Bohac GC, et al. Effect of pemetrexed on innate immune killer cells and adaptive immune T cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *J Immunother.* 2012;35:629–640.
37. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59:1593–1600.
38. Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, et al. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1419–1430.
39. Van Overmeire E, Laoui D, Keirse J, et al. Mechanisms driving macrophage diversity and specialization in distinct tumor microenvironments ANC parallelisms with other tissues. *Front Immunol.* 2014;5:1–16.

40. Kurahara H, Shinci H, Mataka Y, et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2011;167:e211–e219.
41. Monjazez AM, Hsiao HH, Sckisel GD, et al. The role of antigen-specific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer. *J Immunotoxicol*. 2012;9:248–258.
42. Adachi K, Tamada K. Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy. *Cancer Sci*. 2015;106:945–950.
43. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy— revisited. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10:591–600.
44. Rescigno M, Avogadri F, Curigliano G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1776:108–123.
45. Gregoire M. What's the place of immunotherapy in malignant mesothelioma treatments? *Cell Adh Migr*. 2010;4:153–161.
46. Maus MV, Fraietta JA, Levine BL, et al. Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:189–225.
47. Baxter D. Active and passive immunization for cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10:2123–2129.
48. American Cancer Society. Cancer immunotherapy. 2015. Available at: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003013-pdf.pdf>. Accessed February 20, 2016.
49. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:714–727.
50. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:278–287.
51. Jhaveri DT, Zheng L, Jaffee EM. Specificity delivers: therapeutic role of tumor antigen-specific antibodies in pancreatic cancer. *Semin Oncol*. 2014;41:559–575.
52. McLaughlin P, White CA, Grillo-Lopez AJ, et al. Clinical status and optimal use of rituximab for B-cell lymphomas. *Oncology (Williston Park)*. 1998;12:1763–1769. Discussion 1769-1770, 1775-1767.

53. Grillo-Lopez AJ, Hedrick E, Rashford M, et al. Rituximab: ongoing and future clinical development. *Semin Oncol.* 2002; 29:105–112.
54. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol.* 2009;27:2091–2096.
55. Goffin JR, Zbuk K. Epidermal growth factor receptor: pathway, therapies, and pipeline. *Clin Ther.* 2013;35:1282–1303.
56. Vrbic S, Pejcic I, Filipovic S, et al. Current and future anti-Her2 therapy in breast cancer. *J BUON.* 2013;18:4–16.
57. Cid-Arregui A, Juarez V. Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015;21: 9297–9316.
58. Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, et al. Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol.* 2004;22:2610–2616.
59. Philip PA, Benedetti J, Corless CL, et al. Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: South-west Oncology Group-Directed Intergroup Trial S0205. *J Clin Oncol.* 2010;28:3605–3610.
60. Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008;321:1801–1806.
61. Cinar P, Tempero MA. Monoclonal antibodies and other targeted therapies for pancreatic cancer. *Cancer J.* 2012;18: 653–664.
62. Strumberg D, Schultheis B, Scheulen ME, et al. Phase II study of nimotuzumab, a humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody, in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer. *Invest New Drugs.* 2012;30:1138–1143.

63. Su D, Jiao SC, Wang LJ, et al. Efficacy of nimotuzumab plus gemcitabine usage as first-line treatment in patients with advanced pancreatic cancer. *Tumour Biol.* 2014;35: 2313–2318.
64. Lyseng-Williamson KA, Robinson DM. Spotlight on bevacizumab in advanced colorectal cancer, breast cancer, and non-small cell lung cancer. *BioDrugs.* 2006;20:193–195.
65. Kindler HL, Friberg G, Singh DA, et al. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:8033–8040.
66. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the cancer and leukemia group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol.* 2010;28:3617–3622.
67. Beltran PJ, Mitchell P, Chung YA, et al. AMG 479, a fully human anti-insulin-like growth factor receptor type I mono-clonal antibody, inhibits the growth and survival of pancre-atic carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:1095–1105.
68. Calzone FJ, Cajulis E, Chung YA, et al. Epitope-specific mechanisms of IGF1R inhibition by ganitumab. *PLoS One.* 2013;8:e55135.
69. Tolcher AW, Sarantopoulos J, Patnaik A, et al. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of AMG 479, a fully human monoclonal antibody to insulin-like growth factor receptor 1. *J Clin Oncol.* 2009;27:5800–5807.
70. Kindler HL, Richards DA, Garbo LE, et al. A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab (AMG 479) or conatumumab (AMG 655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol.* 2012;23:2834–2842.
71. Fuchs CS, Azevedo S, Okusaka T, et al. A phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ganitumab or placebo in combination with gemcitabine as first-line therapy for metastatic adenocarcinoma of the pancreas: the gamma trial. *Ann Oncol.* 2015;26:921–927.

72. Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, et al. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9: 454–467.
73. Neesse A, Frese KK, Bapiro TE, et al. CTGF antagonism with Mab Fg-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:12325–12330.
74. Ito A, Kondo S, Tada K, et al. Clinical development of immune checkpoint inhibitors. *Biomed Res Int*. 2015;2015: 605478.
75. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245–252.
76. Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, et al. Blockade of B7-H1 or B7-Dc induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. *Int J Oncol*. 2009;35:741–749.
77. Acuto O, Michel F. Cd28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:939–951.
78. Mocellin S, Nitti D. CTLA-4 blockade and the renaissance of cancer immunotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1836: 187–196.
79. Schneider H, Downey J, Smith A, et al. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. 2006;313:1972–1975.
80. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene super-family, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11: 3887–3895.
81. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001;291:319–322.
82. Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, et al. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev*. 2011;241:104–118.
83. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. 2002;17:201–210.
84. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:711–723.

85. Royal RE, Levy C, Turner K, et al. Phase 2 trial of single agent ipilimumab (Anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother.* 2010; 33:828–833.
86. Le DT, Lutz E, Uram JN, et al. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells trans-fected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J Immunother.* 2013;36:382–389.
87. Weber J. Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events. *Oncologist.* 2007;12:864–872.
88. Kirkwood JM, Lorigan P, Hersey P, et al. Phase II trial of tremelimumab (CP-675,206) in patients with advanced refractory or relapsed melanoma. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1042–1048.
89. Sun Y, Wang Y, Zhao J, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2006;53:143–151.
90. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515–548.
91. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996;8:765–772.
92. Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol.* 2001;22:265–268.
93. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26: 677–704.
94. He J, Hu Y, Hu M, et al. Development of PD-1/PD-L1 pathway in tumor immune microenvironment and treatment for non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2015;5:13110.
95. Nomi T, Sho M, Akahori T, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/ programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2151–2157.
96. Geng L, Huang D, Liu J, et al. B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134:1021–1027.

97. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:2455–2465.
98. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369:134–144.
99. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol.* 2008;26:5233–5239.
100. Harris TJ, Drake CG. Primer on tumor immunology and cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2013;1:12.
101. June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest.* 2007;117:1466–1476.
102. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 2002;298: 850–854.
103. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4550–4557.
104. Liao Y, Ou J, Deng J, et al. Clinical implications of the tumor-infiltrating lymphocyte subsets in colorectal cancer. *Med Oncol.* 2013;30:727.
105. Jochems C, Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011;236: 567–579.
106. Kilic A, Landreneau RJ, Luketich JD, et al. Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors. *J Surg Res.* 2011;167:207–210.
107. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1159–1166.

108. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother.* 2003;26:332–342.
109. Junker N, Andersen MH, Wenandy L, et al. Bimodal ex vivo expansion of t cells from patients with head and neck squamous cell carcinoma: a prerequisite for adoptive cell transfer. *Cytotherapy.* 2011;13:822–834.
110. Turcotte S, Gros A, Hogan K, et al. Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy. *J Immunol.* 2013;191:2217–2225.
111. Kershaw MH, Westwood JA, Slaney CY, et al. Clinical application of genetically modified T cells in cancer therapy. *Clin Transl Immunol.* 2014;3:e16.
112. Schmidt-Wolf IG, Finke S, Trojaneck B, et al. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma. *Br J Cancer.* 1999;81:1009–1016.
113. Wu C, Jiang J, Shi L, et al. Prospective study of chemo-therapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2008;28:3997–4002.
114. Jiang JT, Shen YP, Wu CP, et al. Increasing the frequency of CIK cells adoptive immunotherapy may decrease risk of death in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2010;16:6155–6162.
115. Li W, Xu LP, DIZ L, et al. Cytokine-induced killer cell therapy for advanced pancreatic adenocarcinoma: a case report and review of the literature. *Oncol Lett.* 2013;5:1427–1429.
116. Chung MJ, Park JY, Bang S, et al. Phase II clinical trial of ex vivo-expanded cytokine-induced killer cells therapy in advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63:939–946.
117. Shi S, Wang R, Chen Y, et al. Combining antiangiogenic therapy with adoptive cell immunotherapy exerts better antitumor effects in non-small cell lung cancer models. *PLoS One.* 2013;8:e65757.

118. Wang M, Yin B, Wang HY, et al. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 2014;6: 1265–1278.
119. Kawaoka T, Oka M, Takashima M, et al. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer: cytotoxic t lymphocytes stimulated by the MUC1-expressing human pancreatic cancer cell line YPK-1. *Oncol Rep*. 2008;20:155–163
120. Jonckheere N, Van Seuningem I. The membrane-bound mucins: from cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*. 2010;92:1–11.
121. Kondo H, Hazama S, Kawaoka T, et al. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using muc1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes. *Anticancer Res*. 2008;28:379–387.
122. Johnson LA, Heemskerk B, Powell DJ Jr, et al. Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 2006;177: 6548–6559.
123. Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res*. 2015;21:1019–1027.
124. Dodson LF, Hawkins WG, Goedegebuure P. Potential targets for pancreatic cancer immunotherapeutics. *Immunotherapy*. 2011;3:517–537.
125. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:3360–3365.
126. Shirasu N, Shibaguci H, Kuroki M, et al. Construction and molecular characterization of human chimeric T-cell antigen receptors specific for carcinoembryonic antigen. *Anticancer Res*. 2010;30:2731–2738.
127. Wilkie S, Burbridge SE, Chiapero-Stanke L, et al. Selective expansion of chimeric antigen receptor-targeted T-cells with potent effector function using interleukin-4. *J Biol Chem*. 2010;285:25538–25544.

128. Beatty GL, Haas AR, Maus MV, et al. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:112–120.
129. Kleponis J, Skelton R, Zheng L. Fueling the engine and releasing the break: combinational therapy of cancer vaccines and immune checkpoint inhibitors. *Cancer Biol Med.* 2015;12:201–208.
130. Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:630–641.
131. Klebanoff CA, Acquavella N, Yu Z, et al. Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? *Immunol Rev.* 2011;239:27–44.
132. Schlom J. Therapeutic cancer vaccines: current status and moving forward. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:599–613.
133. Gerlich WH. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology.* 2013;10:239.
134. Garland SM, Smith JS. Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. *Drugs.* 2010;70:1079–1098.
135. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, et al. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res.* 2013;119: 421–475.
136. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:411–422.
137. Kantoff PW, Schuetz TJ, Blumenstein BA, et al. Overall survival analysis of a phase ii randomized controlled trial of a poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:1099–1105.
138. Disis ML. Mechanism of action of immunotherapy. *Semin Oncol.* 2014;41(suppl 5):S3–S13.
139. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011;480:480–489.
140. Oyasiji T, Ma WW. Novel adjuvant therapies for pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol.* 2015;6:430–435.

141. Galili U, Clark MR, Shohet SB, et al. Evolutionary relationship between the natural anti-GAL antibody and the GAL alpha 1—3GAL epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:1369–1373.
142. Galili U. The alpha-GAL epitope and the anti-GAL antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2005;83:674–686.
143. Hardacre JM, Mulcahy M, Small W, et al. Addition of algenpantucel-L immunotherapy to standard adjuvant therapy for pancreatic cancer: a phase 2 study. *J Gastrointest Surg*. 2013;17:94–100. Discussion p 100-101.
144. Eager R, Nemunaitis J. GM-CSF gene-transduced tumor vaccines. *Mol Ther*. 2005;12:18–27.
145. Lutz E, Yeo CJ, Lillemoe KD, et al. A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma. A phase II trial of safety, efficacy, and immune activation. *Ann Surg*. 2011;253:328–335.
146. Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity*. 2010;33:464–478.
147. Schuler G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2010;40:2123–2130.
148. Okada H, Kalinski P, Ueda R, et al. Induction of CD8 + T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with {alpha}-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol*. 2011;29:330–336.
149. Wheeler CJ, Black KL. Vaccines for glioblastoma and high-grade glioma. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10:875–886.
150. Cheever MA, Higano CS. Provenge (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res*. 2011;17:3520–3526.

151. Mayanagi S, Kitago M, Sakurai T, et al. Phase I pilot study of wilms tumor gene 1 peptide-pulsed dendritic cell vaccination combined with gemcitabine in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 2015;106:397–406.
152. Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* 1990;60:509–520.
153. Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2004;95:583–587.
154. Rong Y, Qin X, Jin D, et al. A phase I pilot trial of MUC1-peptide-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Clin Exp Med.* 2012;12:173–180.
155. Lin M, Yuan YY, Liu SP, et al. Prospective study of the safety and efficacy of a pancreatic cancer stem cell vaccine. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141:1827–1833.
156. Kubuschok B, Pfreundschuh M, Breit R, et al. Mutated Ras-transfected, Ebv-Transformed lymphoblastoid cell lines as a model tumor vaccine for boosting T-cell responses against pancreatic cancer: a pilot trial. *Hum Gene Ther.* 2012;23: 1224–1236.
157. Abou-Alfa GK, Chapman PB, Feilchenfeldt J, et al. Targeting mutated K-Ras in pancreatic adenocarcinoma using an adjuvant vaccine. *Am J Clin Oncol.* 2011;34:321–325.
158. Yutani S, Komatsu N, Yoshitomi M, et al. A phase II study of a personalized peptide vaccination for chemotherapy-resistant advanced pancreatic cancer patients. *Oncol Rep.* 2013;30:1094–1100.
159. Bernhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, et al. Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study. *Br J Cancer.* 2006;95:1474–1482.
160. Middleton G, Silcocks P, Cox T, et al. Gemcitabine and capecitabine with or without telomerase peptide vaccine Gv1001 in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer (Telovac): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15:829–840.

161. Nishida S, Koido S, Takeda Y, et al. Wilms tumor gene (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immun-ther*. 2014;37:105–114.
162. Taniuchi K, Nakagawa H, Nakamura T, et al. Down-regulation of Rab6kifl/Kif20a, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell. *Cancer Res*. 2005;65:105–112.
163. Suzuki N, Hazama S, Ueno T, et al. A phase I clinical trial of vaccination with KIF20A-derived peptide in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother*. 2014;37:36–42.
164. Asahara S, Takeda K, Yamao K, et al. Phase I/II clinical trial using HLA-A24-restricted peptide vaccine derived from KIF20A for patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med*. 2013;11:291.
165. Aurisicchio L, Ciliberto G. Genetic cancer vaccines: current status and perspectives. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12: 1043–1058.
166. Liu MA, Ulmer JB. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet*. 2005;55:25–40.
167. Kaplan CD, Kruger JA, Zhou H, et al. A novel DNA vaccine encoding pdgfrbeta suppresses growth and dissemination of murine colon, lung and breast carcinoma. *Vaccine*. 2006;24: 6994–7002.
168. Xiang R, Luo Y, Niethammer AG, et al. Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. *Immunol Rev*. 2008; 222:117–128.
169. Chung VM, Hardwick N, Ellenhorn JDI, et al. A phase I study of an MVA vaccine targeting P53 in cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31:3089.
170. Drake CG. Combination immunotherapy approaches. *Ann Oncol*. 2012;23(Suppl 8):viii41–viii46.

PUBLICACIÓN 3

Identification of gene expression profiling associated with erlotinib-related skin toxicity in pancreatic adenocarcinoma patients.

Octavio Caba^a, Antonio Irigoyen^b, Cristina Jimenez-Luna^c, Manuel Benavides^d,
Francisco M. Ortuño^e, Javier Gallego^f, Ignacio Rojas^e, Carmen Guillen-Ponce^g,
Carolina Torres^h, Enrique Arandaⁱ, Jose Prados^c

^aDepartment of Health Sciences, University of Jaen, Jaen, Spain

^bDepartment of Medical Oncology, Virgen de la Salud Hospital, Toledo, Spain

^cInstitute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center of Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain

^dDepartment of Medical Oncology, Virgen de la Victoria Hospital, Malaga, Spain

^eDepartment of Computer Architecture and Computer Technology, Research Center for Information and Communications Technologies, University of Granada, Granada, Spain

^fDepartment of Medical Oncology, General Universitario de Elche Hospital, Alicante, Spain

^gDepartment of Medical Oncology, Ramón y Cajal University Hospital, Madrid, Spain

^hDepartment of Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, USA

ⁱMaimonides Institute of Biomedical Research (IMIBIC), Reina Sofía Hospital, University of Córdoba, Córdoba, Spain

Toxicol Appl Pharmacol. 2016 Nov 15;311:113-116.

Abstract

Erlotinib is an epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor that showed activity against pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The drug's most frequently reported side effect as a result of EGFR inhibition is skin rash (SR), a symptom which has been associated with a better therapeutic response to the drug. Gene expression profiling can be used as a tool to predict which patients will develop this important cutaneous manifestation. The aim of the present study was to identify which genes may influence the appearance of SR in PDAC patients. The study included 34 PDAC patients treated with erlotinib: 21 patients developed any grade of SR, while 13 patients did not (controls). Before administering any chemotherapy regimen and the development of SR, we collected RNA from peripheral blood samples of all patients and studied the differential gene expression pattern using the Illumina microarray platform HumanHT-12 v4 Expression BeadChip. Seven genes (*FAM46C*, *IFITM3*, *GMPR*, *DENND6B*, *SELENBP1*, *NOL10*, and *SIAH2*), involved in different pathways including regulatory, migratory, and signalling processes, were downregulated in PDAC patients with SR. Our results suggest the existence of a gene expression profiling significantly correlated with erlotinib-induced SR in PDAC that could be used as prognostic indicator in these patients.

Keywords

Pancreatic ductal adenocarcinoma, erlotinib, skin rash, microarray

1. Introduction

Erlotinib is an oral epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor that can inhibit cell proliferation at very low concentrations. The receptor is frequently overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and it has been associated with a poor prognosis and disease progression (Nedaeinia et al., 2014).

The combination of gemcitabine plus erlotinib (Tarceva, OSI-774; OSI Pharmaceuticals, Roche, Genentech) (GE) is one of the chemotherapy regimens approved in the management of metastatic PDAC, prolonging slightly patient survival compared to standard gemcitabine monotherapy (Moore et al., 2007). Despite this, the combination of gemcitabine plus EGFR inhibitors has not resulted in significant survival

benefits in all studies performed (Philip et al., 2015). This situation highlights the need to identify those patients that will respond to EGFR inhibition.

On the other hand, EGFR activity is also essential for normal physiological function of the epidermis and its inhibition might cause the appearance of skin rash (SR), the most common side effect of erlotinib (Lacouture et al., 2006). There are several noteworthy studies into non-small-cell lung cancer (NSCLC), head and neck, pancreatic, and ovarian cancers that have reported an increased rate of SR in parallel with improved outcomes (Wacker et al., 2007, Heinemann et al., 2013).

There is clear evidence that variations in inter-patient gene expression patterns could lead to a marked difference in erlotinib metabolism between individuals, modulating both its efficacy and toxicity (Duckett et al., 2010). In the present study, with the objective of discovering determinant genes that could play a significant role in erlotinib-related skin toxicity, we assessed the correlation between the appearance of SR in PDAC patients and the modification in their gene expression profiling.

2. Material and methods

Mediated by the Spanish cooperative group for gastrointestinal tumor therapy (TTD), we selected 34 Caucasian patients with metastatic PDAC (stage IV) from 15 different hospitals between March 2012 and February 2013 (Table 1). The study adhered to the principles of the Declaration of Helsinki, the protocol was approved by each hospital ethical committee, and all patients provided written informed consent. PDAC was diagnosed according to clinical evaluations and imaging studies, which were histologically confirmed during surgery or through imaging-guided biopsy. All patients were treated with GE or GE plus capecitabine (GEX). SR toxicity was assessed clinically according to NCI-CTCAE grading, 21 patients experienced any grade SR and 13 did not.

Characteristic	Skin rash (n = 21)	No skin rash (n = 13)
<i>Age, years</i>		
Median ± SD	59.6 ± 8.56	62.6 ± 3.75
<i>Sex, No. (%)</i>		
Male	16 (47.1)	7 (20.6)
Female	5 (14.7)	6 (17.6)
<i>ECOG performance status, No. (%)</i>		
0	5 (14.7)	4 (11.8)
1	14 (41.2)	8 (23.5)
2	2 (5.9)	1 (2.9)
<i>Treatment, No. (%)</i>		
GE	9 (26.5)	6 (17.6)
GEX	12 (35.3)	7 (20.6)

SD, standard deviation, *GE*, gemcitabine plus erlotinib, *GEX*, gemcitabine-erlotinib plus capecitabine, *ECOG*, eastern cooperative oncology group

Table 1 Patient characteristics.

Prior to any chemotherapy regimen, peripheral blood samples (12 ml) were collected from all patients in PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytix) and stored at room temperature for 24 h. The PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytix) was used for RNA isolation in accordance with the manufacturer’s instructions. The final concentration of purified RNA was assessed by absorbance at 260 nm in a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific) and the quality was assessed using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). All samples had an RNA integrity number (RIN) > 7.0 and a 28S:18S rRNA ratio > 1.0. The gene expression profile was studied with the HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina Inc.), which targets 31,325 annotated genes with more than 47,000 probes. Briefly, 1 µg of high-quality total RNA, isolated using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion), was amplified. This was

then subjected to reverse transcription to produce first and second strand cDNA and biotin-labeled cRNA fragments were generated following the manufacturer's instructions. The labeled cRNA was hybridized overnight to the arrays. The beadchips were washed, stained with dye-labeled streptavidin, and scanned with an Illumina IScan to measure the intensity. The raw data images were analyzed with Illumina Genome Studio software, which generated the average probe intensity for each sample. Expression data was pre-processed by applying Quantile Normalization (QN) from the R package lumi (Du et al., 2008). From the normalized data obtained, we selected the genes most likely to be differentially expressed in patients with SR versus patients without SR by analyzing the gene expression microarray data with the linear models for microarray data (LIMMA) software package (Smyth, 2005).

3. Results and discussion

The microarray data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) with accession number GSE74629. In this study, all healthy controls and two outlier PDAC patients (2 and 9) were excluded.

After normalizing the data, the LIMMA software package was used to analyze global gene expression changes between PDAC patients who experienced any grade of SR and those who did not, identifying 7 genes that present a > two-fold differential expression between the groups (all downregulated; Table 2).

The impact of SR development on the clinical outcome for cancer patients receiving EGFR inhibitor-based therapy has been extensively studied in different types of cancer, such as ovarian (Gordon et al., 2005), head and neck (Soulieres et al., 2004; Cohen et al., 2005), colorectal (Gibson et al., 2006), and lung cancers (Clark et al., 2003; Pérez-Soler et al., 2004; Jackman et al., 2007). Moore and colleagues performed the phase III clinical trial "PA.3" with 282 PDAC patients who received GE; the presence of SR correlated with an increase in overall survival (Moore et al., 2007). Along similar lines, an overall analysis of the phase III studies "PA.3" and "BR.21" reported an association between the presence and severity of erlotinib-induced SR and an improved clinical outcome in both PDAC and NSCLC patients (Wacker et al., 2007). Interestingly, NSCLC patients showed a correlation with all grades of SR, while in PDAC patients only grade ≥ 2 SR was associated with a better outcome. Similarly, a retrospective study involving pancreatic cancer patients treated with GE demonstrated a longer

overall survival in patients presenting severe SR *versus* low severity SR (7.58 vs 5.03 months, respectively) (Stepanski et al., 2013).

Gene	Gene description	ENTREZ	FC	adj.P.Val
<i>FAM46C</i>	family with sequence similarity 46, member C	54,855	-2.6800	0.00925514
<i>IFITM3</i>	interferon induced transmembrane protein 3	10,410	-2.3105	0.00646631
<i>GMPR</i>	guanosine monophosphate reductase	2766	-2.2798	0.00484083
<i>DENND6B</i>	DENN/MADD domain containing 6B	414,918	-2.2449	0.00779633
<i>SELENBP1</i>	selenium binding protein 1	8991	-2.2131	0.00989678
<i>NOL10</i>	nucleolar protein 10	79,954	-2.0088	0.0070647
<i>SIAH2</i>	siah E3 ubiquitin protein ligase 2	6478	-2.0074	0.00700616

FC, fold change

Table 2 Genes associated with erlotinib-induced SR in PDAC patients.

Although several investigations have observed an association between the presence and/or grade of SR and an improved outcome as a result of erlotinib treatment (Pérez-Soler et al., 2004; Moore et al., 2007; Van Cutsem et al., 2009; Heinemann et al., 2013), this correlation seems to be independent of EGFR status (protein expression, gene copy number and mutations) (Wacker et al., 2007). In fact, it has been shown that EGFR expression does not predict the effectiveness of EGFR-inhibitor therapies in pancreatic cancer (Philip et al., 2015). Therefore, it could be very beneficial to find biomarkers that identify patients who will benefit from the addition of erlotinib to their treatment regimen.

It has been shown that the EGFR signalling pathway influences both inflammatory and immune response processes, and that the blockade by EGFR inhibitors affects different blood cell types (Kozuki T. 2016). Therefore, peripheral blood may be an

interesting source of biomarkers that could represent pre-treatment predictors for SR appearance in anti-EGFR therapies.

Many researchers have identified blood biomarkers for skin toxicity during this type of treatment. In this regard, a study involving NSCLC, pancreatic, and colorectal cancer patients treated with EGFR inhibitors identified, in peripheral blood samples, different HLA polymorphisms associated with a lower likelihood of developing SR (Fuerst et al., 2012). In addition, Steffens et al. (2016) suggested that the erlotinib/O-desmethyl-erlotinib ratio in serum may be used as a predictive biomarker of therapeutic response. Arbitrio et al. (2016) recently showed that certain polymorphisms in genes associated with adsorption, distribution, metabolism, and excretion were associated with the presence of SR. Furthermore, hepatocyte growth factor, epiregulin, and amphiregulin serum levels have been correlated with the severity of skin toxicity caused by anti-EGFR therapy in colorectal cancer (Takahashi et al., 2015). Moreover, low serum concentrations of the pro-inflammatory cytokine interleukin-8 have also been associated with greater SR severity and longer survival in cancer patients who have received anti-EGFR treatment (Paul et al., 2014).

Our study focused on discovering a differential gene expression profiling associated with erlotinib-related SR in PDAC patients. Since it has been demonstrated that the appearance of SR during treatment with erlotinib is associated with increased survival in these subjects (Moore et al., 2007; Aranda et al., 2012), the identification of differentially expressed genes can be of interest in order to select the subgroup of patients who will benefit from this treatment.

The genes most downregulated in PDAC patients who developed SR were *FAM46C* and *IFITM3*, both related to the interferon (IFN) pathway. Different studies have highlighted the relationship between intramuscular administration of interferon beta-1a and the appearance of maculopapular rash in patients with multiple sclerosis (Serarslan et al., 2008). The *FAM46C* gene encodes for a type 1 interferon-stimulated protein that contributes to the onset of autoimmune diseases, including lupus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Sjögren's syndrome, and type 1 diabetes (Crow, 2010; Collares et al., 2013). *IFITM3* gene is a member of the IFN-inducible transmembrane protein family (Siegrist et al., 2011), that also plays an important role in different cell processes, including cell adhesion, immune-cell regulation, germ cell homing and maturation, and bone mineralization (Tanaka et al., 2005; Yount et al., 2010). Of note, Mascia et al. (2013) analyzed plasma samples from ovarian cancer patients before and after treatment with EGFR inhibitor therapy. They found that lower

inflammatory mediator pre-treatment levels were associated with a greater severity of SR (Mascia et al., 2013).

GMPR is an enzyme that catalyzes the deamination of GMP to IMP and the reuse of free intracellular bases and purine nucleosides. This protein has been proposed as a potential tumor suppressor that inhibits this regulatory pathway in melanoma cells (Wawrzyniak et al., 2013). The *DENND6B* gene encodes a guanine nucleotide exchange factor involved in the endocytic recycling pathway and the stability of adherens junction in migrating cells. The defect of this protein during wound healing increases cell-cell adhesion and inhibits cell motility (Linford et al., 2012). SELENBP1 is a member of the selenoproteins family which mediates the intracellular selenium transport (Zeng et al., 2013). These proteins are very important in keratinocyte function and skin development, and selenium deficiency has been associated with an increased incidence of epithelial cancers (Klein, 2004).

The NOL10 protein is located in the nucleolus zone involved in ribosomal particle assembly and rRNA processing and, although this protein has been identified in this component, its nucleolar function remains unknown (Wada, et al., 2014). The protein encoded by the *SIAH2* gene is an E3 ligase involved in ubiquitination and subsequent proteasome-mediated degradation of target proteins. Given that it triggers the destruction of different substrates, including anti-apoptotic proteins (BAG1), transcription regulation proteins (POU2AF1, PML, NCOR1), and cell surface receptors (DCC), it therefore plays a part in apoptosis, tumor suppression, cell cycle, transcription, and signalling processes (García-Limones et al., 2016). The correct expression of this gene is also involved in correct skin development. Thus, it has been observed that in *Siah2*^{-/-} mice dermal fibroblasts produce less collagen and present minor migratory capacities, resulting in decreased cutaneous wound healing in these specimens (Musyoka et al., 2013).

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [grant number TIN2015-71873-R], and the Instituto de Salud Carlos III [grant number DTS15/00201].

References

- Aranda, E., Manzano, J.L., Rivera, F., Galán, M., Valladares-Ayerbes, M., Pericay, C., Safont, M.J., Mendez, M.J., Irigoyen, A., Arrivi, A., Sastre, J., Díaz-Rubio, E., 2012. Phase II open-label study of erlotinib in combination with gemcitabine in unresectable and/or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: relationship between skin rash and survival (Pantar study). *Ann. Oncol.* 23:1919–25. doi: 10.1093/annonc/mdr560.
- Arbitrio, M., Di Martino, M.T., Barbieri, V., Agapito, G., Guzzi, P.H., Botta, C., Iuliano, E., Scionti, F., Altomare, E., Codispoti, S., Conforti, S., Cannataro, M., Tassone, P., Tagliaferri, P., 2016. Identification of polymorphic variants associated with erlotinib-related skin toxicity in advanced non-small cell lung cancer patients by DMET microarray analysis. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 77:205-9. doi: 10.1007/s00280-015-2916-3.
- Clark, G.M., Pérez-Soler, R., Siu, L., Gordon, A., Santabárbara, P., 2003. Rash severity is predictive of increased survival with erlotinib hydrochloride. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22:196 (abstract 786).
- Cohen, E.E., Kane, M.A., List, M.A., Brockstein, B.E., Mehrotra, B., Huo, D., Mauer, A.M., Pierce, C., Dekker, A., Vokes, E.E., 2005. Phase II trial of gefitinib 250 mg daily in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer. Res.* 11:8418–24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1247.
- Collares, C.V., Evangelista, A.F., Xavier, D.J., Takahashi, P., Almeida, R., Macedo, C., Manoel-Caetano, F., Foss, M.C., Foss-Freitas, M.C., Rassi, D.M., Sakamoto-Hojo, E.T., Passos, G.A., Donadi, E.A., 2013. Transcriptome meta-analysis of peripheral lymphomononuclear cells indicates that gestational diabetes is closer to type 1 diabetes than to type 2 diabetes mellitus. *Mol. Biol. Rep.* 40:5351-5358. doi: 10.1007/s11033-013-2635-y.
- Crow, M.K., 2010. Type I interferon in organ-targeted autoimmune and inflammatory diseases. *Arthritis. Res. Ther.* 12(Suppl 1):S5. doi: 10.1186/ar2886.
- Du, P., Kibbe, W.A., Lin, S.M., 2008. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics.* 24:1547-1548. doi: 10.1093/bioinformatics/btn224.
- Duckett, D.R., Cameron, M.D., 2010. Metabolism considerations for kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 6:1175-1193. doi: 10.1517/17425255.2010.506873.

Fuerst, D., Parmar, S., Schumann, C., Rüdiger, S., Boeck, S., Heinemann, V., Kaechele, V., Stiebel, K., Paul, T., Seufferlein, T., Mytilineos, J., Stingl, J.C., 2012. HLA polymorphisms influence the development of skin rash arising from treatment with EGF receptor inhibitors. *Pharmacogenomics*. 13:1469-76. doi: 10.2217/pgs.12.122.

García-Limones, C., Lara-Chica, M., Jiménez-Jiménez, C., Pérez, M., Moreno, P., Muñoz, E., Calzado, M.A., 2016. CHK2 stability is regulated by the E3 ubiquitin ligase SIAH2. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2015.495. [Epub ahead of print]

Gibson, T.B., Ranganathan, A., Grothey, A., 2006. Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal. Cancer*. 6:29-31. doi: 10.3816/CCC.2006.n.01.

Gordon, A.N., Finkler, N., Edwards, R.P., Garcia, A.A., Crozier, M., Irwin, D.H., Barrett, E., 2005. Efficacy and safety of erlotinib HCl, an epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR) tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ovarian carcinoma: results from a phase II multicenter study. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 15(5):785–92. Doi: 10.1111/j.1525-1438.2005.00137.x.

Heinemann, V., Vehling-Kaiser, U., Waldschmidt, D., Kettner, E., Märten, A., Winkelmann, C., Klein, S., Kojouharoff, G., Gauler, T.C., von Weikersthal, L.F., Clemens, M.R., Geissler, M., Greten, T.F., Hegewisch-Becker, S., Rubanov, O., Baake, G., Höhler, T., Ko, Y.D., Jung, A., Neugebauer, S., Boeck, S., 2013. Gemcitabine plus erlotinib followed by capecitabine versus capecitabine plus erlotinib followed by gemcitabine in advanced pancreatic cancer: final results of a randomised phase 3 trial of the 'Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie' (AIO-PK0104). *Gut*. 62:751-9. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302759.

Jackman, D.M., Yeap, B.Y., Lindeman, N.I., Lindeman, N.I., Fidias, P., Rabin, M.S., Temel, J., Skarin, A.T., Meyerson, M., Holmes, A.J., Borrás, A.M., Freidlin, B., Ostler, P.A., Lucca, J., Lynch, T.J., Johnson, B.E., Jänne, P.A., 2007. Phase II clinical trial of chemotherapy-naive patients > or = 70 years of age treated with erlotinib for advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol*. 25:760–6. doi: 10.1200/JCO.2006.07.5754.

Klein, E.A., 2004. Selenium and vitamin E cancer prevention trial. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1031:234-241.

Kozuki, T., 2016. Skin problems and EGFR-tyrosine kinase inhibitor. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 46:291-8. doi: 10.1093/jjco/hyv207.

Lacouture, M.E., 2006. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* 6:803-812.

Linford, A., Yoshimura, S., Nunes Bastos, R., Langemeyer, L., Gerondopoulos, A., Rigden, D.J., Barr, F.A., 2012. Rab14 and its exchange factor FAM116 link endocytic recycling and adherens junction stability in migrating cells. *Dev. Cell.* 22:952-966. doi: 10.1016/j.devcel.2012.04.010.

Mascia, F., Lam, G., Keith, C., Garber, C., Steinberg, S.M., Kohn, E., Yuspa, S.H., 2013. Genetic ablation of epidermal EGFR reveals the dynamic origin of adverse effects of anti-EGFR therapy. *Sci. Transl. Med.* 5:199ra110. doi: 10.1126/scitranslmed.3005773.

Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., Campos, D., Lim, R., Ding, K., Clark, G., Voskoglou-Nomikos, T., Ptasynski, M., Parulekar, W., 2007. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* 25:1960-1966.

Musyoka, J.N., Liu, M.C., Pouniotis, D.S., Wong, C.S., Bowtell, D.D., Little, P.J., Getachew, R., Möller, A., Darby, I.A., 2013. Siah2-deficient mice show impaired skin wound repair. *Wound. Repair. Regen.* 21:437-447. doi: 10.1111/wrr.12045.

Nedaeinia R, Avan A, Manian M, Salehi R, Ghayour-Mobarhan M1. EGFR as a potential target for the treatment of pancreatic cancer: dilemma and controversies. *Curr Drug Targets.* 2014;15(14):1293-301.

Paul, T., Schumann, C., Rüdiger, S., Boeck, S., Heinemann, V., Kächele, V., Steffens, M., Scholl, C., Hichert, V., Seufferlein, T., Stingl, J.C., 2014. Cytokine regulation by epidermal growth factor receptor inhibitors and epidermal growth factor receptor inhibitor associated skin toxicity in cancer patients. *Eur. J. Cancer.* 50:1855-63. doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.026.

Pérez-Soler, R., Chachoua, A., Hammond, L.A., Rowinsky, E.K., Huberman, M., Karp, D., Rigas, J., Clark, G.M., Santabárbara, P., Bonomi, P., 2004. Determinants of tumor

response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 22:3238–47. doi: 10.1200/JCO.2004.11.057.

Philip, P.A., Lutz, M.P., 2015. Targeting epidermal growth factor receptor-related signaling pathways in pancreatic cancer. *Pancreas.* 44:1046–52.

Serarslan, G., Okuyucu, E., Melek, I., Hakverdi, S., Duman, T., 2008. Widespread maculopapular rash due to intramuscular interferon beta-1a during the treatment of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 14:259-261. doi: 10.1177/1352458507079945.

Siegrist, F., Ebeling, M., Certa, U., 2011. The small interferon-induced transmembrane genes and proteins. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 31:183 –197. doi: 10.1089/jir.2010.0112.

Smyth, G., 2005. Limma: linear models for microarray data, in: Gentleman, R., Carey, V., Huber, W., Irizarry, R., Dudoit, S. (Eds.), *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York, pp. 397-420.

Soulieres, D., Senzer, N.N., Vokes, E.E., Hidalgo, M., Agarwala, S.S., Siu, L.L., 2004. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J. Clin. Oncol.* 22:77–85. doi: 10.1200/JCO.2004.06.075.

Steffens, M., Paul, T., Hichert, V., Scholl, C., von Mallek, D., Stelzer, C., Sörgel, F., Reiser, B., Schumann, C., Rüdiger, S., Boeck, S., Heinemann, V., Kächele, V., Seufferlein, T., Stingl, J., 2016. Dosing to rash?--The role of erlotinib metabolic ratio from patient serum in the search of predictive biomarkers for EGFR inhibitor-mediated skin rash. *Eur. J. Cancer.* 55:131-9. doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.022.

Stepanski, E.J., Reyes, C., Walker, M.S., Satram-Hoang, S., Leon, L., Wojtowicz-Praga, S., Miller, P.J., Houts, A.C., Schwartzberg, L.S., 2013. The association of rash severity with overall survival: findings from patients receiving erlotinib for pancreatic cancer in the community setting. *Pancreas.* 42:32-6. doi: 10.1097/MPA.0b013e318254f19a.

Takahashi, N., Yamada, Y., Furuta, K., Nagashima, K., Kubo, A., Sasaki, Y., Shoji, H., Honma, Y., Iwasa, S., Okita, N., Takashima, A., Kato, K., Hamaguchi, T., Shimada, Y., 2015. Association between serum ligands and the skin toxicity of anti-epidermal growth factor receptor antibody in metastatic colorectal cancer. *Cancer. Sci.* 106:604-10. doi: 10.1111/cas.12642.

Tanaka, S.S., Yamaguchi, Y.L., Tsoi, B., Lickert, H., Tam, P.P., 2005. IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev. Cell.* 9:745–756.

Van Cutsem, E., Vervenne, W.L., Bennouna, J., Humblet, Y., Gill, S., Van Laethem, J.L., Verslype, C., Scheithauer, W., Shang, A., Cosaert, J., Moore, M.J., 2009. Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 27:2231–7. doi: 10.1200/JCO.2008.20.0238.

Wacker, B., Nagrani, T., Weinberg, J., Witt, K., Clark, G., Cagnoni, P.J., 2007. Correlation between development of rash and efficacy in patients treated with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in two large phase III studies. *Clin. Cancer. Res.* 13:3913-21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2610.

Wada, K., Sato, M., Araki, N., Kumeta, M., Hirai, Y., Takeyasu, K., Furukawa, K., Horigome, T., 2014. Dynamics of WD-repeat containing proteins in SSU processome components. *Biochem. Cell. Biol.* 92:191-199. doi: 10.1139/bcb-2014-0007.

Wawrzyniak, J.A., Bianchi-Smiraglia, A., Bshara, W., Mannava, S., Ackroyd, J., Bagati, A., Omilian, A.R., Im, M., Fedtsova, N., Miecznikowski, J.C., Moparthy, K.C., Zucker, S.N., Zhu, Q., Kozlova, N.I., Berman, A.E., Hoek, K.S., Gudkov, A.V., Shewach, D.S., Morrison, C.D., Nikiforov, M.A., 2013. A purine nucleotide biosynthesis enzyme guanosine monophosphate reductase is a suppressor of melanoma invasion. *Cell. Rep.* 5:493-507. doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.015.

Yount, J.S., Moltedo, B., Yang, Y.Y., Charron, G., Moran, T.M., Lopez, C.B., Hang, H.C., 2010. Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nat. Chem. Biol.* 6:610-614. doi: 10.1038/nchembio.405.

Zeng, G.Q., Yi, H., Zhang, P.F., Li, X.H., Hu, R., Li, M.Y., Li, C., Qu, J.Q., Deng, X., Xiao, Z.Q., 2013. The function and significance of SELENBP1 downregulation in human bronchial epithelial carcinogenic process. *PLoS. One.* 8:e71865. doi: 10.1371/journal.pone.0071865.

PUBLICACIÓN 4

Integrative multi-platform meta-analysis of gene expression profiles in pancreatic ductal adenocarcinoma patients for identifying novel diagnostic biomarkers

Antonio Irigoyen¹, Octavio Caba², Manuel Benavides³, Cristina Jimenez-Luna⁴, Javier Gallego⁵, Francisco M. Ortuño⁶, Carmen Guillen-Ponce⁷, Ignacio Rojas⁶, Enrique Aranda⁸, Carolina Torres⁹ and Jose Prados⁴

¹Department of Medical Oncology, Virgen de la Salud Hospital, Toledo 45071, Spain

²Department of Health Sciences, University of Jaen, Jaen 23071, Spain

³Department of Medical Oncology, Virgen de la Victoria Hospital, Málaga 29010, Spain

⁴Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center of Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada 18100, Spain

⁵Department of Medical Oncology, General Universitario de Elche Hospital, Alicante 03203, Spain

⁶Department of Computer Architecture and Computer Technology, Research Center for Information and Communications Technologies, University of Granada, Granada, 18014, Spain

⁷Department of Medical Oncology, Universitario Ramón y Cajal Hospital, Madrid 28034, Spain

⁹Maimonides Institute of Biomedical Research (IMIBIC), Reina Sofía Hospital, University of Córdoba, Córdoba 14004, Spain

¹⁰Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada 18071, Spain

BMC Genomics (submitted since April 7, 2016)

Abstract

Background: Applying differentially expressed genes (DEGs) to identify feasible biomarkers in diseases can be a hard task when working with heterogeneous datasets. Expression data are strongly influenced by technology, sample preparation processes, and/or labeling methods. The proliferation of different microarray platforms for measuring gene expression increases the need to develop models able to compare their results, especially when different technologies can lead to signal values that vary greatly. Integrative meta-analysis can significantly improve the reliability and robustness of DEG detection. The objective of this work was to develop an integrative approach for identifying potential cancer biomarkers by integrating gene expression data from two different platforms. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), where there is an urgent need to find new biomarkers due its late diagnosis, is an ideal candidate for testing this technology.

Results: Expression data from two different datasets, namely Affymetrix and Illumina (18 and 36 PDAC patients, respectively), as well as from 18 healthy controls, was used for this study. A meta-analysis based on an empirical Bayesian methodology (ComBat) was then proposed to integrate these datasets. DEGs were finally identified from the integrated data by using the statistical programming language R. After our integrative meta-analysis, 5 genes were commonly identified within the individual analyses of the independent datasets. Also, 28 novel genes that were not reported by the individual analyses ('gained' genes) were also discovered. Several of these gained genes have been already related to other gastroenterological tumors.

Conclusions: The proposed integrative meta-analysis has revealed novel DEGs that may play an important role in PDAC and could be potential biomarkers for diagnosing the disease.

Keywords: Meta-analysis, Microarray, Integration, Pancreatic ductal adenocarcinoma, Biomarker discovery

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most common type of pancreatic cancer (PC), is the fourth leading cause of cancer death in Western countries, with a 5-year survival rate of about 4% and a median survival rate of less than 6 months [1]. At the time of diagnosis, 80% of patients with PDAC are found to have unresectable, locally advanced or metastatic disease [2]. The absence of reliable biomarkers for population screening is one of the most important limitations in the management of this malignancy [3].

Currently, the only biomarker in routine clinical use for PDAC is the carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) [4]. However, recent studies found this biomarker to be an unreliable diagnostic tool due to its limited sensitivity (~80%) and specificity (80–90%) [5]. Furthermore, elevated levels of CA19–9 may also appear in pancreatitis [6], benign diseases of the hepatobiliary system [7] and other malignancies of the gastrointestinal tract [8].

Microarray techniques have become a useful tool for determining gene expression profiles in cancer, allowing the discovery of possible tumor biomarkers [9]. However, sometimes biopsy from tumoral tissues can be complex and present complications. In this context, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) constitute an alternative, non-invasive source for finding tumor biomarkers [10, 11]. These cells suffer modifications in their gene expression profile when in contact with the tumor microenvironment [12], and may therefore be used as an accessible source of cancer biomarkers.

Additionally, the so-called meta-analysis techniques have been increasingly employed to integrate data from different microarray platforms, making this technology more consistent and powerful. These meta-analyses are especially useful for combining several datasets related to the same disease when they are limited in size, therefore improving their statistical power [13]. Meta-analyses have recently been applied to identify DEGs in several tumor studies, including in breast [14, 15], ovarian [16] and pancreatic cancers [17]. One of the main challenges in a meta-analysis is to adequately integrate datasets obtained using different platforms in order to make them comparable. Various methods have been developed to normalize datasets and provide reliable integration, removing batch effects and making cross-platform corrections, such as Distance Weighted Discrimination (DWD) [18], empirical Bayes methods (ComBat) [19], and cross-platform normalization (XPN) [20]. In this sense, ComBat and

XPN have been proven to outperform DWD in term of minimizing inter-platform variance [13].

In this study, an integrated meta-analysis of two gene expression datasets from PDAC data was proposed for identifying DEGs in patients. The datasets were collected from two different microarray platforms, namely Affymetrix and Illumina. The expression data was integrated using an empirical Bayes method (ComBat) to avoid bias between the platforms.

Results

Patient Characteristics

Our study included two independent cohorts of patients. The first group (1) included 18 PDAC patients and the independent cohort (2) comprised 36 PDAC patients. Table 1 shows the most relevant clinical characteristics of the patients from each cohort.

Cohort 1, selected from our previous study [21], consisted of 9 men (50 %) and 9 women (50 %) with a mean age of 61.4 (range 37–76). None of the patients had a history of chronic pancreatitis, but 7 (38.9 %) had a history of type II diabetes mellitus prior to being diagnosed with PDAC. At the time of diagnosis, 12 patients (66.6 %) had stage IV tumors and 6 (33.4 %) presented stage III tumors.

The PDAC patients from Cohort 2 comprised 24 men (67 %) and 12 women (33 %) with a mean age of 60.0 (range 42–73). Only 2 patients (5.6 %) had a history of chronic pancreatitis, however, 14 patients (38.9 %) had a history of type II diabetes mellitus. At the time of diagnosis, all patients had stage IV tumors.

Also, 18 healthy subjects were also included in the study. The control group consisted of 10 men (55.6 %) and 8 women (44.4 %) with a mean age of 60.4 (age range 35–74 years); none of these subjects had a history of either chronic pancreatitis or type II diabetes mellitus.

Characteristic	Cohort 1 (n=18) N°. case (%)	Cohort 2 (n=36) N°. case (%)
Sex		
Male	9 (50 %)	24 (67 %)
Female	9 (50 %)	12 (33 %)
Age Mean±SD	61.4±10.7	60.0±7.7
Maximum	76	73
Minimum	37	42
Pancreatitis		
Yes	0 (0 %)	2 (5.6 %)
No	18 (100 %)	34 (94.4 %)
Diabetes		
Yes	7 (38.9 %)	14 (38.9 %)
No	11 (61.1 %)	22 (61.1 %)
Stage		
I	0 (0 %)	0 (0 %)
II	0 (0 %)	0 (0 %)
III	6 (33.3 %)	0 (0 %)
IV	12 (66.7 %)	36 (100 %)

Table 1. Characteristics of both Cohort 1 and Cohort 2 groups of PDAC patients.

Differential Gene Expression Profiling of PBMCs from PDAC Patients

After normalization and integration using *virtual Array*, the statistical differences in gene expression between the PDAC patients and healthy controls were analyzed with *limma* software. The data was integrated following the ComBat approach. From this meta-analysis, 72 genes were consistently identified as being differentially expressed ($p < 0.01$) with at least a 1.5-fold differential expression between the groups. Of these 72 genes, 39 were overexpressed and 33 repressed (Table 2 and Additional files 1, 2 and 3).

Gene	Gene description	ENTREZ ^a	FC ^b	adj.P.Val
<i>FAIM3</i>	Fas apoptotic inhibitory molecule 3	9214	- 2.17	4.59E-11
<i>IRAK3</i>	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	11213	1.84	4.59E-11
<i>DENND2D</i>	DENN/MADD domain containing 2D	79961	- 1.67	1.08E-09
<i>PLBD1</i>	phospholipase B domain containing 1	79887	1.67	1.50E-09
<i>AGPAT9</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	84803	1.58	1.47E-08

^aEntrez Gene Name

^bFold change

Table 2. Coincident genes in the three analyses: Affymetrix, Illumina and integrated meta-analysis.

The meta-analysis findings were also compared with those obtained by individual analyses in both datasets to evaluate bias and reproducibility across the microarray studies. As a result, 14 genes already identified in the Affymetrix study were also highlighted by our meta-analysis, whereas 35 genes were shared with the Illumina study (Figure 1). Five of these genes were consistently identified by the three studies (Affymetrix, Illumina and integrated meta-analysis) (Table 2). Additionally, 28 gained genes were found. Gained genes are those identified as differentially expressed in the meta-analysis but not in the individual studies. These genes may be only weakly relevant individually but provide more consistent expression patterns when several datasets are integrated [27].

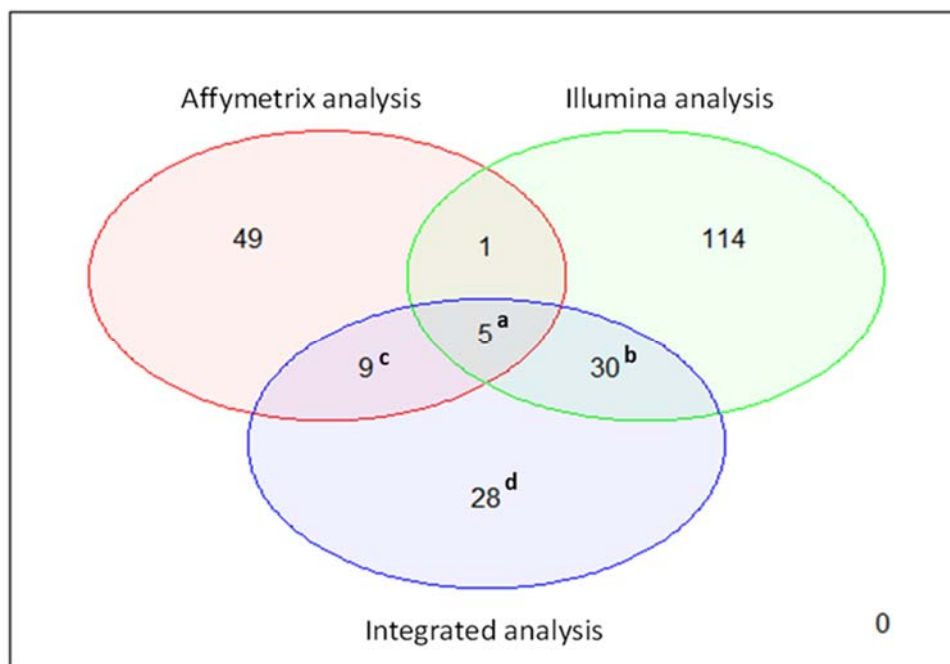


Figure 1 Comparison of individual analyses by technology with integrated analysis.

^aCoincident genes in the three analyses: Affymetrix, Illumina and integrated meta-analysis (Table 2). ^bRemaining differentially expressed genes in individual Illumina and the integrative meta-analysis (Additional file 1). ^cRemaining differentially expressed genes in individual Affymetrix and the integrative meta-analysis (Additional file 2). ^dDifferentially expressed genes in the integrative meta-analysis but not in individual analyses (gained genes) (Additional file 3)

Discussion

Affymetrix GeneChips and Illumina BeadChips are the main platforms used for gene expression microarrays. However, non-trivial systematic bias (batch effects) can occur in both making it necessary to use appropriate correction methods when integrating the datasets from the two technologies [13]. Also, differences in sequences and the number of probes make it even more difficult to integrate their datasets. Consequently, a complex integration method is mandatory in order to successfully perform consistent meta-analyses.

Several batch correction and cross-platform normalization approaches have been proposed for this purpose, including mean-centering (MC), Distance Weighted Discrimination (DWD), and empirical Bayesian (ComBat) method. Even though the three proposals were compared for this integrated meta-analysis, the ComBat approach was finally selected. ComBat has been highly recommended in the literature due to its reduced computational cost and the fact it is independent of sample size [25].

It has also proven to be fairly useful in reducing inter-platform variance, outperforming other similar approaches such as DWD or MC [13].

Other similar meta-analyses have already been carried out to identify biomarkers in pancreatic cancers from several microarray datasets [17]. Nevertheless, these solutions provide DEGs merely by statistically determining the intersection between datasets. In contrast, a more thorough integrative approach including batch correction and cross-platform normalization is proposed in this work.

After this integration, 5 genes, namely *FAM13*, *IRAK3*, *DENND2D*, *PLBD1* and *AGPAT9*, were identified as being commonly differentially expressed by the individual analyses in Affymetrix and Illumina as well as by the integrated meta-analysis. These genes were considered reliable targets since they showed consistent differential expression in the integrated analysis. In fact, *IRAK-3* has already been studied and validated by RT-qPCR in our previous study using Affymetrix [21]. Also, the other three genes validated in Affymetrix, namely *ANKRD22*, *CLEC4D* and *VNN1* were similarly identified in the proposed meta-analysis.

More specifically, our results showed downregulation of the gene encoding for the Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (*FAIM3* or *TOSO*), which plays an important role in the immune system as it encodes an Fc receptor for immunoglobulins (Ig), M. Fc receptors specifically bind to the Fc region of Igs to mediate the unique functions of each class [28, 29]. The expression of *FAIM3* is reported in peripheral blood leukocytes and detected in high levels in chronic lymphocytic leukemia cells [21, 30]. It has been demonstrated that a decrease in *FAIM3* expression results in increased apoptosis, however, increased *FAIM3* expression resulting from CD25 antibody treatment protects T cells from IL-2-mediated activation-induced cell death (AICD) [31] underlining an involvement in the immune process.

The upregulation of the gene IL-1 Receptor-Associated Kinase 3 (*IRAK3*) may provide a clue about the mechanisms leading to immune evasion by tumor cells. This gene is expressed in monocytes and macrophages [32] and can be triggered by Toll-like receptors (TLRs) [33, 34], which are expressed in various types of cancer [35]. Overall, *IRAK-3* activation leads to immunosuppression [36] and allows the communication between tumor cells and macrophages facilitating cancer progression and a favorable microenvironment for the tumor [37, 38]. In fact, monocytes from chronic myeloid leukemia and metastatic cancer patients present *IRAK-3* upregulation, leading to tumor formation and growth [21, 37, 39].

The DENN/MADD Domain Containing 2D gene (*DENND2D*), another modified gene related to the immune system, has been suggested as a tumor suppressor gene [40]. DENN-domain proteins are differentially expressed in normal and neoplastic cells and regulate Rab GTPases, which play important roles in differentiation, proliferation processes, and regulation of cancer cells, among other things [40-42]. *DENND2D* has been proposed to suppress the tumorigenicity and proliferation of lung cancer cells [43, 44]. In addition, the *DENND2D* mRNA expression level has been found to be significantly lower in esophageal squamous cell carcinoma tissues, hepatocellular carcinoma [45], lung cancers, immortalized bronchial epithelial cell lines and other precancerous lesions [40, 44].

In our study, the gene expression level coding for Phospholipase B Domain Containing 1 (*PLBD1*) was shown to be elevated in PDAC patients. This gene is highly expressed in neutrophils and monocytes [46] and members of this family have been related to antibacterial defense [47].

Metastatic ability is one of the major problems associated with pancreatic cancer. In this regard, our study reveals the overexpression of the 1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 9 (*AGPAT9* or *MAG-1*) gene, which has been associated with the metastatic process in lung cancer [48, 49]. Various important functions of *AGPAT9* have been described in this metastatic process. First, *AGPAT9* is involved in the adaptation to the microenvironment, regulating the metabolism and hypoxia, and contributing to vascular development increasing the expression of VEGF. Furthermore, *AGPAT9* is involved in mTOR pathway activation which is key in the metastatic process [50].

Additionally, 28 novel gained genes were found to have more robust patterns in the meta-analysis than in individual studies, making them statistically more significant as possible biomarkers (Additional file 3).

Upregulated Annexin A3 (*ANXA3*) and downregulated Membrane-Spanning 4-Domains Subfamily A Member 1 (*MS4A1*) were novel gained genes discovered using this technique. These results are supported by Baine *et al.*, who also included both genes as part of a predictor set of biomarkers in the PBMC of PC patients [51]. Also, Haptoglobin (*HP*) and Lipocalin 2 (*LCN2*) appeared upregulated in this new set of genes. The presence of fucosylated *HP* in serum has been associated to many cancers including hepatocellular, gastric and colon cancers, but the highest incidence has been observed in PC, mainly at an advanced stage [52]. Increased *LCN2* levels have been related to the epithelial to mesenchymal transition [53] and proposed as a

serum marker for familial PC [54]. Moreover, we observed the upregulation of other genes like CD177 Molecule (*CD177*), Phospholipid Scramblase 1 (*PLSCR1*), Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor (*SLPI*), S100 Calcium Binding Protein A12 (*S100A12*) and Integrin Beta 3 (*ITGB3*), all of them related to the development of different gastrointestinal tumors [55-59].

It is also noteworthy that all the novel genes that appeared downregulated are associated with the immune response: Granulysin (*GNLY*) functions as a chemotactic for T-lymphocytes, monocytes and other inflammatory cells [60]; Natural Killer Cell Granule Protein 7 (*NKG7*) is expressed in several cell types, including NK and T-cells [61]; C-type Lectin Domain Family 2, Member D (*CLEC2D*) is a receptor present in NK cells [62]; TXK Tyrosine Kinase (*TKX*) takes part in the Th1 cytokine production and is implicated in the adaptive immune response [63]; and RAS Guanyl Releasing Protein 1 (*RASGRP1*) has been found to play an important role in T-cell development [64].

Conclusions

An innovative meta-analysis has been performed to combine two gene expression datasets containing PDAC data and identify robust DEGs in these patients. Integrative meta-analyses have been shown to be powerful tools for identifying more robust DEGs when working with different data sources. Thus, an empirical Bayes approach (ComBat) has been employed in this study to integrate data from two different microarray technologies, namely Affymetrix GeneChip® Human Gene ST 1.0 Arrays and Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip, removing the batch effect between technologies and increasing the statistical significance of the subsequent analysis. The integrative analysis has confirmed the DEGs previously published for the Affymetrix data but has also located a set of gained genes that were not robust enough to be identified in the individual analyses. Thus, most of the genes identified have already been annotated as biomarkers in PDAC whereas other gained genes observed in this meta-analysis have also been related to several gastroenterological cancers. The proposed method has therefore been proven useful for more in-depth analysis of heterogeneous expression datasets, improving the identification of DEGs and discovering novel potential biomarkers for diagnosing PDAC. Future RT-qPCR studies will be performed to validate the gained genes that are considered interesting for this purpose.

Methods

Study Population

The 54 patients with unresectable PDAC recruited in this study were divided into two independent cohorts. Samples from cohort 1, selected from our previous study [21], include 18 patients with PDAC recruited from January 2009 to July 2012 at the Virgen de las Nieves University Hospital in Granada. Cohort 2 was also independent and included 36 new patients with PDAC, from a phase 2 randomized trial, recruited from March 2012 to February 2013 from 15 different hospitals mediated by the Spanish cooperative group for gastrointestinal tumor therapy (TTD). The diagnosis of PDAC was based on clinical evaluation and imaging studies, which were histologically confirmed by surgery or imaging-guided biopsy. The same enrolment criteria were applied to both cohorts. Finally, 18 gender-, age-, and habit- matched healthy controls were included. The study was approved by the Ethics Committee of the different hospitals, and all clinical investigations were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients and controls before their enrolment in the study.

Blood Collection and Isolation of Total RNA from PBMCs

Prior to any chemotherapy regimen, peripheral blood samples (12 ml) from all patients and healthy controls were collected in PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytix) and stored at room temperature for 24 hours, to achieve complete lysis of the blood cells and immediate and persistent RNA stabilization. The RNA from PBMCs was isolated using the PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytix) according to the manufacturer's instructions. The final concentration of purified RNA was quantified by absorbance at 260 nm in a NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific). The quality was determined using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). All samples presented an RNA integrity number (RIN) >7.0 and a 28S:18S rRNA ratio >1.0.

cDNA Microarray Analysis

Whole genome cDNA microarray hybridization of samples was performed using two different platforms to identify potential PDAC markers. Affymetrix microarray-based gene expression profiling was carried out on the samples from the patients included in Cohort 1 and 18 healthy controls, using GeneChip® Human Gene ST 1.0 Arrays (Affymetrix Inc.) according to the recommended protocol. Briefly, 1 µg of high-quality total RNA was used to synthesize double-stranded cDNA, and biotin-tagged cRNA was produced. This cRNA was recovered, purified and then hybridized to the chips

overnight at 45° C. After being washed and stained, the arrays were scanned with a GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix Inc.) following the manufacturer's protocol.

The gene expression levels of Cohort 2 and the same healthy controls were measured using the HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina Inc.). Briefly, 1 µg of high-quality total RNA isolated using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion) was amplified. Then, it was reverse transcribed into first and second strand cDNA, and biotin labeled cRNA were generated following the manufacturer's instructions. This labeled cRNA was hybridized overnight to the arrays. The beadchips were washed, stained with dye-labeled streptavidin, and scanned with an Illumina IScan to measure the intensity. The raw data images were analyzed with Illumina Genome Studio software, which generated an average probe intensity for each sample.

Microarray data processing and integrative meta-analysis

All data processing and integration procedures were performed using the R statistical programming language. The data was integrated by adapting the scheme from Turbull *et al.* [13] with particular stages for the analysis of PDAC data in Affymetrix and Illumina. The workflow of the proposed meta-analysis is shown in Figure 2. More specifically, hybridization data from Affymetrix (Cohort 1) were first normalized using Robust Multi-array Average (RMA) analysis from the Bio-conductor R package *oligo* [22]. In the same way, Illumina expression data (Cohort 2) was pre-processed by applying Quantile Normalization (QN) from the R package *lumi* [23]. In both cases, genes with low variability expression values were discarded to reduce false-positive rates.

Data from both platforms were integrated with the *virtual Array* software R package [24]. This software allows data from different microarray platforms to be merged by considering several batch effect removal and cross-platform correction methods. Specifically, the data was integrated using the empirical Bayes method (ComBat) [19]. The ComBat method merges the information from several genes with similar expression distributions in each dataset to estimate the average and variance in each of those genes [25]. From the integrated data, those genes most likely to be differentially expressed in PDAC patients *versus* controls were selected by analyzing the gene expression microarray data with the linear models for microarray data (*limma*) software package [26].

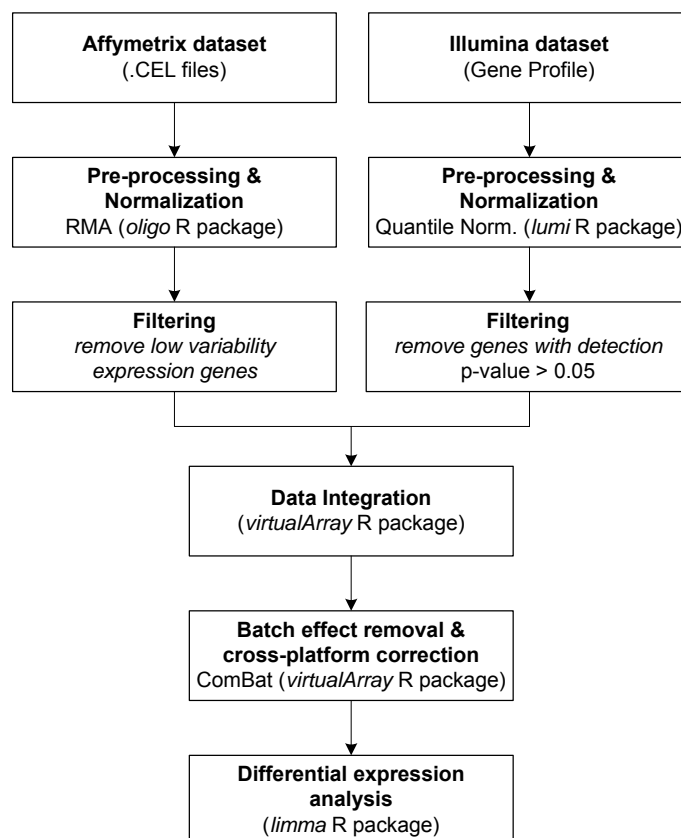


Figure 2. Workflow of the whole integrated meta-analysis for integration of Affymetrix/Illumina expression data from PDAC datasets.

Availability of data and material

Data deposition: the data from both microarrays reported in this paper were deposited in the Gene Expression Omni-bus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) with accession numbers GSE49641 and GSE74629 for the Affymetrix and Illumina platforms, respectively.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (grant number DTS15/00201 to OC), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant number TIN2015-71873-R to IR), the Junta de Andalucía (grant number P12-TIC-2082 to IR) and the University of Granada (grant number 15/13 to OC).

Bibliography

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:5-29. doi: 10.3322/caac.21254.
2. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2010;362:1605-17. doi: 10.1056/NEJMra0901557.
3. Chan A, Diamandis EP, Blasutig IM. Strategies for discovering novel pancreatic cancer biomarkers. *J Proteomics.* 2013;81:126-34. doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.025.
4. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goere D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up dagger. *Ann Oncol.* 2015;26 Suppl 5:v56-v68. doi: 10.1093/annonc/mdv295.
5. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33:266-70. doi: 10.1016/j.ejso.2006.10.004.
6. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol.* 1990;85:350-5.
7. O'Brien DP, Sandanayake NS, Jenkinson C, Gentry-Maharaj A, Apostolidou S, Fourkala EO, et al. Serum CA19-9 is significantly upregulated up to 2 years before diagnosis with pancreatic cancer: implications for early disease detection. *Clin Cancer Res.* 2015;21:622-31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0365.
8. Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R, Haglund C, Holubec VL, Klapdor R, et al. Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Ann Oncol.* 2010;21:441-7. doi: 10.1093/annonc/mdp332.
9. Sotiriou C, Piccart MJ. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer.* 2007;7:545-53. doi: 10.1038/nrc2173.
10. Huang H, Dong X, Kang MX, Xu B, Chen Y, Zhang B, et al. Novel blood biomarkers of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus identified by peripheral blood-based gene expression profiles. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:1661-9. doi: 10.1038/ajg.2010.32.

11. Tanday S. Biomarkers in blood could help to detect pancreatic cancer. *Lancet Oncol.* 2014;15:e108.
12. Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature.* 2003;425:905. doi: 10.1038/425905a.
13. Turnbull AK, Kitchen RR, Larionov AA, Renshaw L, Dixon JM, Sims AH. Direct integration of intensity-level data from Affymetrix and Illumina microarrays improves statistical power for robust reanalysis. *BMC Med Genomics.* 2012;5:35. doi: 10.1186/1755-8794-5-35.
14. Pavlou MP, Dimitromanolakis A, Martinez-Morillo E, Smid M, Foekens JA, Diamandis EP. Integrating meta-analysis of microarray data and targeted proteomics for biomarker identification: application in breast cancer. *J Proteome Res.* 2014;13:2897-909. doi: 10.1021/pr500352e.
15. Yasrebi H. Comparative study of joint analysis of microarray gene expression data in survival prediction and risk assessment of breast cancer patients. *Brief Bioinform.* 2015. doi: 10.1093/bib/bbv092.
16. Waldron L, Haibe-Kains B, Culhane AC, Riester M, Ding J, Wang XV, et al. Comparative Meta-analysis of Prognostic Gene Signatures for Late-Stage Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106. doi: 10.1093/jnci/dju049.
17. Goonesekere NCW, Wang X, Ludwig L, Guda C. A Meta Analysis of Pancreatic Microarray Datasets Yields New Targets as Cancer Genes and Biomarkers. *PLoS One.* 2014;9:e93046. doi: 10.1371/journal.pone.0093046.
18. Benito M, Parker J, Du Q, Wu JY, Xang D, Perou CM, et al. Adjustment of systematic microarray data biases. *Bioinformatics.* 2004;20:105-14. doi: 10.1093/bioinformatics/btg385.
19. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics.* 2007;8:118-27. doi: 10.1093/biostatistics/kxj037.
20. Shabalina AA, Tjelmeland H, Fan C, Perou CM, Nobel AB. Merging two gene-expression studies via cross-platform normalization. *Bioinformatics.* 2008;24:1154-60. doi: 10.1093/bioinformatics/btn083.

21. Caba O, Prados J, Ortiz R, Jimenez-Luna C, Melguizo C, Alvarez PJ, et al. Transcriptional profiling of peripheral blood in pancreatic adenocarcinoma patients identifies diagnostic biomarkers. *Dig Dis Sci*. 2014;59:2714-20. doi: 10.1007/s10620-014-3291-3.
22. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics*. 2010;26:2363-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btq431.
23. Du P, Kibbe WA, Lin SM. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*. 2008;24:1547-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btn224.
24. Heider A, Alt R. virtualArray: a R/bioconductor package to merge raw data from different microarray platforms. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:75. doi: 10.1186/1471-2105-14-75.
25. Lazar C, Meganck S, Taminau J, Steenhoff D, Coletta A, Molter C, et al. Batch effect removal methods for microarray gene expression data integration: a survey. *Briefings in Bioinformatics*. 2013;14:469-90. doi: 10.1093/bib/bbs037.
26. Smyth G. Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S, editors. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. New York: Springer; 2005. p. 397-420.
27. Toro-Dominguez D, Carmona-Saez P, Alarcon-Riquelme ME. Shared signatures between rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome uncovered through gene expression meta-analysis. *Arthritis Research & Therapy*. 2014;16. doi: 10.1186/s13075-014-0489-x.
28. Kubagawa H, Carroll MC, Jacob CO, Lang KS, Lee KH, Mak T, et al. Nomenclature of Toso, Fas apoptosis inhibitory molecule 3, and IgM FcR. *J Immunol*. 2015;194:4055-7. doi: 10.4049/jimmunol.1500222.
29. Lang KS, Lang PA, Meryk A, Pandyra AA, Boucher LM, Pozdeev VI, et al. Involvement of Toso in activation of monocytes, macrophages, and granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:2593-8. doi: 10.1073/pnas.1222264110.
30. Vire B, David A, Wiestner A. TOSO, the Fcmicro receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation. *J Immunol*. 2011;187:4040-50. doi: 10.4049/jimmunol.1100532.

31. Richter GH, Mollweide A, Hanewinkel K, Zobywalski C, Burdach S. CD25 blockade protects T cells from activation-induced cell death (AICD) via maintenance of TOSO expression. *Scand J Immunol.* 2009;70:206-15. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02281.x.
32. Kumar Pachathundikandi S, Brandt S, Madassery J, Backert S. Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *Helicobacter pylori* switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF-alpha. *PLoS One.* 2011;6:e19614. doi: 10.1371/journal.pone.0019614.
33. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 2008;226:10-8. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00701.x.
34. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C917-24. doi: 10.1152/ajpcell.00401.2005.
35. Jain A, Kaczanowska S, Davila E. IL-1 Receptor-Associated Kinase Signaling and Its Role in Inflammation, Cancer Progression, and Therapy Resistance. *Front Immunol.* 2014;5:553. doi: 10.3389/fimmu.2014.00553.
36. Zhou H, Yu M, Fukuda K, Im J, Yao P, Cui W, et al. IRAK-M mediates Toll-like receptor/IL-1R-induced NFkappaB activation and cytokine production. *EMBO J.* 2013;32:583-96. doi: 10.1038/emboj.2013.2.
37. del Fresno C, Otero K, Gomez-Garcia L, Gonzalez-Leon MC, Soler-Ranger L, Fuentes-Prior P, et al. Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *J Immunol.* 2005;174:3032-40.
38. Soares-Schanoski A, Jurado T, Cordoba R, Siliceo M, Fresno CD, Gomez-Pina V, et al. Impaired antigen presentation and potent phagocytic activity identifying tumor-tolerant human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423:331-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.05.124.
39. Kuo CC, Shih YL, Su HY, Yan MD, Hsieh CB, Liu CY, et al. Methylation of IRAK3 is a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015;21:3960-9. doi: 10.3748/wjg.v21.i13.3960.
40. Hibino S, Kanda M, Oya H, Takami H, Shimizu D, Nomoto S, et al. Reduced expression of DENND2D through promoter hypermethylation is an adverse

- prognostic factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol Rep.* 2014;31:693-700. doi: 10.3892/or.2013.2901.
41. Subramani D, Alahari SK. Integrin-mediated function of Rab GTPases in cancer progression. *Mol Cancer.* 2010;9:312. doi: 10.1186/1476-4598-9-312.
 42. Cheng KW, Lahad JP, Kuo WL, Lapuk A, Yamada K, Auersperg N, et al. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med.* 2004;10:1251-6. doi: 10.1038/nm1125.
 43. Marat AL, Dokainish H, McPherson PS. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *J Biol Chem.* 2011;286:13791-800. doi: 10.1074/jbc.R110.217067.
 44. Ling B, Zheng H, Fu G, Yuan J, Shi T, Chen S, et al. Suppression of non-small cell lung cancer proliferation and tumorigenicity by DENND2D. *Lung Cancer.* 2013;79:104-10. doi: 10.1016/j.lungcan.2012.10.012.
 45. Kanda M, Nomoto S, Oya H, Takami H, Hibino S, Hishida M, et al. Downregulation of DENND2D by promoter hypermethylation is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2014;44:44-52. doi: 10.3892/ijo.2013.2165.
 46. Xu S, Zhao L, Larsson A, Venge P. The identification of a phospholipase B precursor in human neutrophils. *FEBS J.* 2009;276:175-86. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06771.x.
 47. Koduri RS, Gronroos JO, Laine VJ, Le Calvez C, Lambeau G, Nevalainen TJ, et al. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J Biol Chem.* 2002;277:5849-57. doi: 10.1074/jbc.M109699200.
 48. Jiang Y, Zhang W, Kondo K, Klco JM, St Martin TB, Dufault MR, et al. Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways. *Mol Cancer Res.* 2003;1:453-62.
 49. Zhang J, Meng Y, Lin H, Liu G, Wang Y, Chen H, et al. [Promotion of MAG-1 on Metastasis of Lung Cancer Cells in vitro and Its Expression in Lung Cancer Tissue of 24 Cases.]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2009;12:93-9. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2009.02.01.
 50. Wang Y, Jia H, Lin H, Tan X, Du Z, Chen H, et al. Metastasis-associated gene, mag-1 improves tumour microenvironmental adaptation and potentiates tumour

- metastasis. *J Cell Mol Med.* 2012;16:3037-51. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01633.x.
51. Baine MJ, Chakraborty S, Smith LM, Mallya K, Sasson AR, Brand RE, et al. Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. *PLoS One.* 2011;6:e17014. doi: 10.1371/journal.pone.0017014.
52. Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, et al. Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int J Cancer.* 2006;118:2803-8. doi: 10.1002/ijc.21728.
53. Rodvold JJ, Mahadevan NR, Zanetti M. Lipocalin 2 in cancer: when good immunity goes bad. *Cancer Lett.* 2012;316:132-8. doi: 10.1016/j.canlet.2011.11.002.
54. Slater EP, Fendrich V, Strauch K, Rospleszcz S, Ramaswamy A, Matthai E, et al. LCN2 and TIMP1 as Potential Serum Markers for the Early Detection of Familial Pancreatic Cancer. *Transl Oncol.* 2013;6:99-103.
55. Toyoda T, Tsukamoto T, Yamamoto M, Ban H, Saito N, Takasu S, et al. Gene expression analysis of a Helicobacter pylori-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model: identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:122. doi: 10.1186/1471-230X-13-122.
56. Fan CW, Chen CY, Chen KT, Shen CR, Kuo YB, Chen YS, et al. Blockade of phospholipid scramblase 1 with its N-terminal domain antibody reduces tumorigenesis of colorectal carcinomas in vitro and in vivo. *J Transl Med.* 2012;10:254. doi: 10.1186/1479-5876-10-254.
57. Guo J, Li G, Zhuang J, Ji C, Liu F, Tao G, et al. [Expression and clinical significance of secretory leucocyte protease inhibitor in colon carcinoma]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2013;33:898-901.
58. Thierolf M, Hagmann ML, Pfeffer M, Berntenis N, Wild N, Roessler M, et al. Towards a comprehensive proteome of normal and malignant human colon tissue by 2-D-LC-ESI-MS and 2-DE proteomics and identification of S100A12 as potential cancer biomarker. *Proteomics Clin Appl.* 2008;2:11-22. doi: 10.1002/prca.200780046.

59. Lei Y, Huang K, Gao C, Lau QC, Pan H, Xie K, et al. Proteomics identification of ITGB3 as a key regulator in reactive oxygen species-induced migration and invasion of colorectal cancer cells. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10:M110 005397. doi: 10.1074/mcp.M110.005397.
60. Krensky AM, Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. *Tissue Antigens*. 2009;73:193-8. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01218.x.
61. Turman MA, Yabe T, McSherry C, Bach FH, Houchins JP. Characterization of a novel gene (NKG7) on human chromosome 19 that is expressed in natural killer cells and T cells. *Hum Immunol*. 1993;36:34-40.
62. Germain C, Meier A, Jensen T, Knapnougel P, Poupon G, Lazzari A, et al. Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon-gamma contributes to modulate immune responses. *J Biol Chem*. 2011;286:37964-75. doi: 10.1074/jbc.M111.285312.
63. Tavares TS, Nanus D, Yang XJ, Gudas LJ. Gene microarray analysis of human renal cell carcinoma: the effects of HDAC inhibition and retinoid treatment. *Cancer Biol Ther*. 2008;7:1607-18.
64. Ksionda O, Limnander A, Roose JP. RasGRP Ras guanine nucleotide exchange factors in cancer. *Front Biol (Beijing)*. 2013;8:508-32. doi: 10.1007/s11515-013-1276-9.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Additional file 1. Remaining differentially expressed genes in individual Illumina and the integrative meta-analysis.						
ENTREZ	SYMBOL	GENENAME	logFC	adj.P.Val	B	FC
4318	MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	1.12	1.91E-04	3.49	2.18
3560	IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	-0.98	5.50E-07	10.88	-1.96
3575	IL7R	interleukin 7 receptor	-0.96	5.80E-07	10.71	-1.96
3945	LDHB	lactate dehydrogenase B	-0.96	5.64E-05	5.01	-1.92
1236	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	-0.95	3.79E-07	11.39	-1.92
353514	LILRA5	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5	0.91	5.69E-06	7.83	1.89
23569	PADI4	peptidyl arginine deiminase, type IV	0.88	8.34E-07	10.23	1.83
973	CD79A	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	-0.86	1.10E-05	7.08	-1.82
51176	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	-0.86	5.50E-07	10.82	-1.82
6191	RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked	-0.83	6.19E-04	1.98	-1.79
3820	KLRB1	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	-0.8	2.71E-07	11.89	-1.75
5583	PRKCH	protein kinase C, eta	-0.76	5.18E-08	13.9	-1.69
2205	FCER1A	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide	-0.74	8.77E-07	10.1	-1.67
3674	ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)	0.74	8.40E-05	4.56	1.67
916	CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)	-0.74	8.77E-07	10.1	-1.67
7850	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	0.73	5.43E-04	2.15	1.66
939	CD27	CD27 molecule	-0.72	5.18E-08	13.95	-1.64
3702	ITK	IL2-inducible T-cell kinase	-0.7	1.41E-06	9.56	-1.61
2113	ETS1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	-0.69	1.11E-03	1.22	-1.61
762	CA4	carbonic anhydrase IV	0.67	2.92E-06	8.64	1.60
10410	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	0.67	2.80E-03	0.15	1.59
1462	VCAN	versican	0.66	1.09E-04	4.23	1.58
340205	TREML1	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	0.66	7.55E-04	1.7	1.58
6194	RPS6	ribosomal protein S6	-0.66	1.59E-04	3.74	-1.59
3101	HK3	hexokinase 3 (white cell)	0.65	4.33E-06	8.14	1.57
2162	F13A1	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	0.64	3.38E-03	-0.09	1.55
6556	SLC11A1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporter), member 1	0.62	9.55E-04	1.41	1.54
5610	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	0.62	5.07E-05	5.19	1.54
919	CD247	CD247 molecule	-0.6	5.64E-07	10.76	-1.52
3003	GZMK	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)	-0.6	1.78E-04	3.59	-1.52

Additional file 2. Remaining differentially expressed genes in individual Affymetrix and the integrative meta-analysis.						
ENTREZ	SYMBOL	GENENAME	logFC	adj.P.Val	B	FC
6279	S100A8	S100 calcium binding protein A8	0.93	8.20E-05	4.59	1.90
118932	ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	0.86	6.22E-08	13.67	1.81
8876	VNN1	vanin 1	0.84	4.07E-07	11.29	1.79
2153	F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	0.77	5.22E-09	16.89	1.71
383	ARG1	arginase 1	0.71	3.45E-04	2.72	1.64
54674	LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3	-0.71	7.24E-06	7.56	-1.64
64757	MARC1	mitochondrial amidoxime reducing component 1	0.66	5.50E-07	10.84	1.58
338339	CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	0.6	1.55E-04	3.79	1.52
115352	FCRL3	Fc receptor-like 3	-0.59	5.84E-11	22.01	-1.49

Additional file 3. Differentially expressed genes in the integrative meta-analysis but not in individual analysis (<i>gained genes</i>)						
ENTREZ	SYMBOL	GENENAME	logFC	adj.P.Val	B	FC
57126	CD177	CD177 molecule	1.02	7.32E-04	1.75	2.02
6283	S100A12	S100 calcium binding protein A12	0.93	1.98E-04	3.44	1.91
3690	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	0.84	6.56E-04	1.88	1.79
3240	HP	haptoglobin	0.82	2.37E-05	6.13	1.76
306	ANXA3	annexin A3	0.81	1.06E-04	4.25	1.76
931	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	-0.8	1.64E-06	9.35	-1.72
671	BPI	bactericidal/permeability-increasing protein	0.73	7.89E-04	1.65	1.66
10578	GNLY	granulysin	-0.72	3.88E-04	2.57	-1.64
123036	TC2N	tandem C2 domains, nuclear	-0.72	1.85E-03	0.62	-1.64
6234	RPS28	ribosomal protein S28	-0.68	4.68E-05	5.28	-1.61
4818	NKG7	natural killer cell granule protein 7	-0.68	1.76E-04	3.61	-1.61
3934	LCN2	lipocalin 2	0.68	6.22E-03	-0.85	1.60
29121	CLEC2D	C-type lectin domain family 2, member D	-0.66	2.69E-04	3.02	-1.59
2352	FOLR3	folate receptor 3 (gamma)	0.66	1.94E-03	0.57	1.58
7294	TXK	TXK tyrosine kinase	-0.66	3.82E-05	5.53	-1.59
10125	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	-0.65	3.06E-06	8.56	-1.56
5359	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	0.64	3.12E-07	11.68	1.56
6590	SLPI	secretory leukocyte peptidase inhibitor	0.64	8.20E-04	1.6	1.55
6480	ST6GAL1	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	-0.63	3.60E-10	19.99	-1.56
10398	MYL9	myosin, light chain 9, regulatory	0.62	2.33E-04	3.22	1.53
81539	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	-0.62	1.11E-05	7.06	-1.54
26253	CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	0.61	2.92E-05	5.89	1.53
117157	SH2D1B	SH2 domain containing 1B	-0.61	5.50E-07	10.86	-1.52
6844	VAMP2	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	-0.61	3.02E-06	8.6	-1.52
353345	GPR141	G protein-coupled receptor 141	0.6	4.77E-05	5.25	1.51
58484	NLRC4	NLR family, CARD domain containing 4	0.59	2.65E-07	11.95	1.51
8291	DYSF	dysferlin	0.59	6.61E-04	1.87	1.51
6272	SORT1	sortilin 1	0.59	9.80E-08	13.03	1.50

Discusión

VII. DISCUSIÓN

A pesar de los recientes avances en el tratamiento y diagnóstico del PDAC, el más común de los tumores de páncreas, esta patología sigue siendo un problema sanitario de primer orden, no tanto por su incidencia, baja en relación a otros tipos tumorales, como por su mortalidad, que se considera extremadamente elevada [18]. Uno de los factores esenciales de la presente situación es la imposibilidad de hacer un diagnóstico precoz de la enfermedad por la falta de síntomas específicos y la no existencia de marcadores fiables que permitan detectarla. En consecuencia, en el momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes no son aptos para la realización de una resección quirúrgica curativa [7], lo que conduce a unas muy bajas tasas de supervivencia tanto en el primer año como en los primeros cinco años tras el diagnóstico [22]. De hecho, solo alrededor del 20% de los pacientes presentan enfermedad resecable en el momento del diagnóstico [11]. Esta circunstancia, unida al previsible aumento de las tasas de incidencia y mortalidad de la enfermedad en los próximos años [23], pone de manifiesto la importancia de lograr un diagnóstico temprano para mejorar el pronóstico de estos pacientes [285]. En este contexto y basándonos en técnicas de microarrays, nuestro trabajo de investigación pretende avanzar en la determinación de nuevos biomarcadores que puedan ser detectados en sangre periférica y que ayuden a diagnosticar el PDAC y/o puedan ser factores predictivos de la respuesta al tratamiento actual.

1. Modulación de la expresión génica de PBMCs como marcador de la presencia de PDAC

Los avances moleculares sobre el PDAC han permitido ensayar un gran número de biomarcadores para su detección. Sin embargo, CA19-9 continúa siendo el único biomarcador utilizado en la rutina clínica. Entre sus limitaciones destacan el aumento de su nivel en suero ante patologías no tumorales y la

incapacidad de síntesis, incluso en condiciones neoplásicas, por parte de un sector de la población [65]. Por tanto, dada su limitada precisión, no se recomienda como herramienta diagnóstica para esta enfermedad [84]. Son numerosas las moléculas ensayadas como nuevos biomarcadores diagnósticos de esta patología. Sin embargo, su prueba de validación ante grandes cohortes de estudio independientes ha revelado, con mucha frecuencia, su falta de precisión y sus bajos valores de sensibilidad y especificidad, reduciendo, por tanto, su aplicabilidad clínica [267].

Una vía de búsqueda de nuevos marcadores de patología tumoral se ha basado en la influencia que ejerce la enfermedad neoplásica sobre el sistema inmune en general y sobre las PBMCs en particular [274]. En este sentido, numerosos estudios han evaluado la utilidad de las PBMCs como biomarcadores en cáncer [276], siendo de particular interés el estudio de las alteraciones transcriptómicas en estas células. Las estrategias explotadas por las células tumorales para lograr la evasión de la respuesta inmunitaria y su reconocimiento por parte de las células inmunes, se han propuesto como eventos principales en la alteración del perfil de expresión génica observado en las PBMCs de pacientes con cáncer. Los cambios observados en fases iniciales de la carcinogénesis hacen del estudio de las PBMCs una herramienta potencialmente útil en la detección temprana del PDAC [283].

Whitney y cols. (2003) realizaron un primer estudio sobre pacientes con linfoma difuso de células B grandes y leucemia linfocítica crónica. Sus resultados mostraron variación en el perfil de expresión génica de los pacientes con cáncer [286], sugiriendo que el transcriptoma de las PBMCs podría constituir un biomarcador potencial para el diagnóstico del cáncer. Similares resultados se obtuvieron en pacientes con carcinoma renal avanzado, demostrando la utilidad diagnóstica del perfil de expresión génica de las PBMCs más allá de las neoplasias hematológicas [287].

En el contexto del PDAC, Huang y cols. [282] identificaron 48 genes diferencialmente expresados entre PBMCs de pacientes con cáncer de páncreas y de sujetos sanos. Posteriormente, se demostró la sobreexpresión del gen *OLFM4*, implicado en el control de la proliferación, diferenciación y

apoptosis celular [288], en pacientes con PDAC *versus* controles sanos con una diferencia de más de 4 *folds*, sugiriendo su uso como biomarcador de *screening* para PDAC [289]. No obstante, el estudio fue realizado con un tamaño muestral muy reducido (5 pacientes con PDAC y 5 sujetos sanos), no pudiendo corroborarse los resultados en estudios más amplios. En la misma dirección, Baine y cols. [283] propusieron un panel de 8 genes con expresión alterada como biomarcador para el PDAC, mostrando una precisión diagnóstica del 79%. Posteriormente, los mismos autores modificaron ligeramente este conjunto de genes y aumentaron el tamaño muestral, consiguiendo un panel biomarcador que, combinado con los niveles de CA19-9 en plasma, era capaz de discriminar entre pacientes con cáncer de páncreas resecable y pacientes con pancreatitis crónica mejor que el CA19-9 solo [284].

Nuestro estudio analiza el perfil de expresión génica de PBMCs de pacientes con PDAC e individuos sanos utilizando la técnica de microarrays. Los resultados han permitido identificar un conjunto de 87 genes que mostraban diferencias de expresión significativas entre ambos grupos. De este grupo, 9 genes mostraban una diferencia ≥ 2 *folds*. Dada la naturaleza de la muestra empleada, seleccionamos aquellos genes que estaban relacionados con la respuesta inmune y/o proteínas de unión en plasma con el objetivo de establecer un panel de biomarcadores capaz de discriminar entre pacientes con PDAC e individuos sanos. Dicho panel estuvo formado por los genes *ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1* e *IRAK3*, todos ellos con expresión elevada en pacientes con PDAC. Además, con el objetivo de validar los resultados obtenidos por una técnica alternativa al microarray, evaluamos las diferencias de expresión de estos genes en la misma cohorte de pacientes con PDAC, observándose resultados de expresión génica muy similares a los obtenidos previamente.

El gen *ANKRD22* presentó la mayor sobrerregulación en las muestras de PDAC, con valores de expresión 3,26 y 3,06 veces superiores a los controles sanos, medidos por microarrays y qPCR, respectivamente. Actualmente, se desconoce la función de este gen, aunque ha sido patentado por Rosenthal y cols. (referencia US20130065791A1) como biomarcador para detección

temprana y *screening* en cáncer colorrectal [290] y por Brichard y cols. (referencia WO2007140958A2) como biomarcador de respuesta a inmunoterapia en cáncer [291]. Nuestros resultados apoyan los del ya mencionado estudio de Baine y cols. [283] quienes demostraron la sobreexpresión de *ANKRD22* en PBMCs de pacientes con PDAC dentro de un panel de 8 genes que permitía distinguir entre pacientes e individuos sanos con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 75%. Sin embargo, la diferencia de expresión obtenida en este estudio para *ANKRD22* mediante microarrays (1,676 *fold*s) no fue tan elevada como en nuestro caso (3,26 *fold*s). Además, aunque su estudio de validación por qPCR mostró sobreexpresión de *ANKRD22* (1,16 *fold*s), esta no alcanzó el punto de corte fijado por los autores (>1,5 *fold*s). Las discrepancias con nuestros resultados podrían deberse a la población de estudio seleccionada, que incluía diferentes estadios de la enfermedad. En nuestro estudio, la homogeneidad de la cohorte de pacientes evitó el posible sesgo de la fase tumoral en la expresión génica [292].

Los genes *CLEC4D* y *VNN1* aparecieron también sobreexpresados en nuestros pacientes con PDAC mostrando *fold changes* similares tanto en los estudios mediante microarrays como en los de qPCR (2,36 y 2,21, respectivamente para *CLEC4D*; 2,34 y 2,17, respectivamente para *VNN1*). *CLEC4D* pertenece a la familia de receptores lectina tipo C y se expresa en ciertas poblaciones celulares de sangre periférica como en monocitos inflamatorios (CD14+ CD16-) y en neutrófilos (CD16+), lo que sugiere su implicación en procesos de la inmunidad innata. Sin embargo, no se expresa en otros leucocitos de sangre periférica como células T CD8+ o CD4+, células B CD19+ y células NK CD56+ [293]. Se ha sugerido que este receptor está implicado en la captación de antígenos en el sitio de infección, bien para su eliminación o para su procesamiento y posterior presentación a células T [294]. Además, se ha observado su participación en la inducción de fagocitosis y producción de citoquinas proinflamatorias (como el factor de necrosis tumoral - TNF), apoyando su papel en procesos de reconocimiento y eliminación de patógenos [293]. Estudios *in vitro* demuestran la sobreexpresión de este gen tras la exposición a citoquinas como IL-6, TNF α , interferón (IFN) γ e IL-10, en macrófagos, neutrófilos y monocitos humanos [293, 294], citoquinas, todas

ellas, relacionadas con la tumorigénesis pancreática. De hecho, estas citoquinas son producidas en el microambiente tumoral por las propias células neoplásicas o por las células inmunes, desencadenando una respuesta protumoral por parte de los linfocitos T *helper* (Th) 2 y promoviendo el crecimiento de las células tumorales [295, 296]. El hecho de que *CLEC4D* se sobreexpresen en PBMCs al exponerse a estas citoquinas *in vitro* sugiere que, en los pacientes con PDAC, estas mismas células podrían modular la expresión del receptor al entrar en contacto con el microambiente tumoral, reflejando la presencia de un proceso neoplásico en el paciente.

El gen *VNN1* codifica para una ectoenzima anclada a la superficie de distintos tipos celulares [297], como células estromales del timo, células epiteliales perivasculares y otros tipos celulares relacionados con los vasos sanguíneos [298]. Este gen está implicado en la colonización del timo por células precursoras hematopoyéticas, aunque también se ha relacionado con la colonización de otros órganos [298, 299]. Se ha descrito la participación de *VNN1* en procesos de adhesión [299] y migración celular [300], activación de la gluconeogénesis hepática [301] y estrés oxidativo [297, 302], este último, asociado a varias enfermedades autoinmunes (diabetes tipo I) [302]. En este sentido, varios estudios han detectado niveles incrementados de *VNN1* en la orina y sangre de pacientes diabéticos [301] y en PBMCs sometidas a estrés oxidativo [302]. Además, *VNN1* podría participar en el control de la producción de factores proinflamatorios por parte de células epiteliales [303], lo que vincula la expresión del gen con procesos de inflamación [297, 300]. Así mismo, se ha demostrado que la expresión de *VNN1* puede ser inducida por la exposición a citoquinas proinflamatorias, como IFN γ y TNF α [304]. Estudios en modelos murinos de cáncer de colon asociado a enfermedad inflamatoria intestinal, sugieren que la proteína codificada por este gen podría estar implicada en la proliferación epitelial y/o inflamación, dado que mayor expresión de *VNN1* se asoció con la activación del promotor tumoral NF- κ B [303]. Estos autores demostraron que ratones *knockout* para *VNN1* presentaban menor desarrollo tumoral debido a una menor activación de vías inflamatorias en las células epiteliales intestinales. Así, postulan que la expresión epitelial de *VNN1* crea unas condiciones favorables para el desarrollo tumoral, aumentando el estado

inflamatorio en el microambiente pretumoral. Dado el impacto del microambiente en la tumorigénesis del PDAC [305-308], el contacto de las PBMCs con citoquinas proinflamatorias en el entorno tumoral podría explicar los incrementos de expresión de *VNN1* en estos pacientes.

Ambos genes, *CLEC4D* y *VNN1*, fueron incluidos por Marshall y cols. [309] en un panel de 7 genes para discriminar entre pacientes con cáncer colorrectal y personas sanas empleando ARN de PBMCs. Sus resultados mostraron una precisión del 71%, una sensibilidad del 72% y una especificidad del 70%. Posteriormente, este panel fue validado en una población de estudio que incluía diferentes grupos étnicos con distintas susceptibilidades para cáncer colorrectal, consiguiendo resultados comparables a los obtenidos en su estudio previo [310] y determinando las fases de la enfermedad [311]. Los valores de expresión obtenidos para ambos genes fueron menores que los detectados en nuestros pacientes con PDAC, lo que podría atribuirse al tipo tumoral estudiado. Por otra parte, la sobreexpresión de *VNN1* asociada a la del gen *MMP-9* fue observada en pacientes con diabetes *mellitus* y cáncer de páncreas, de modo que estos autores propusieron la determinación de esta combinación de genes como un sistema para discriminar entre estos pacientes y aquellos que sólo presentaban diabetes *mellitus* tipo II. Obtuvieron una sensibilidad del 95,8% y una especificidad del 76%, destacando la utilidad de estos genes en la detección temprana del cáncer de páncreas en este grupo de riesgo [282]. En nuestro estudio, no se observaron diferencias en la expresión de *MMP-9* entre pacientes y controles, probablemente debido a la baja prevalencia de diabetes tipo II en el grupo de pacientes seleccionados.

Otra de las alteraciones identificadas en nuestros pacientes con PDAC fue la sobreexpresión en las PBMCs del gen *IRAK3* (microarrays 2,1; qPCR 2,07 *folds*). La expresión de este gen se ha descrito principalmente en monocitos y macrófagos [312], aunque también se ha detectado en otros tipos celulares, como fibroblastos, células B y células epiteliales alveolares [313]. El gen *IRAK3* está implicado en la señalización inmune innata y adaptativa [314], siendo un importante regulador negativo en el contexto de la señalización de los receptores tipo Toll (TLR) y en la homeostasis de la inmunidad innata [312].

Cuando los TLRs se activan, se desencadena la señalización NF- κ B y MAPK, lo que culmina con la inducción de genes de defensa dando lugar a procesos inflamatorios [315]. *IRAK3* modula la activación de los TLRs ya que controla la producción de citoquinas inflamatorias a través de la regulación negativa de la señalización TLR4, actuando como un inhibidor de las vías NF- κ B [315] y MAPK [316].

Estudios en modelos murinos con diabetes tipo I han señalado la relación entre la deficiencia de *IRAK3* (*IRAK3*^{-/-}) y los procesos de autoinmunidad, conduciendo a una rápida progresión de la enfermedad, y demostrando su papel modulador sobre la respuesta inmune innata [317]. De esta forma, *IRAK3* ayuda a desactivar la señalización inmune y prevenir respuestas inflamatorias excesivas. Sin embargo, las células tumorales pueden explotar la función inhibitoria de *IRAK3* para evadir la vigilancia inmune [314, 318]. Su expresión puede desactivar la inflamación antitumoral, amortiguando la actividad de NF- κ B en las células inmunes durante el fenómeno de tolerancia [312]. Los resultados en ratones *IRAK3*^{-/-} inoculados con células tumorales murinas de melanoma y fibrosarcoma (B16-F0 y TM-7, respectivamente), indican que las deficiencias en la expresión de este gen potencian la respuesta inmune contra el tumor, y por tanto, la resistencia al crecimiento tumoral [314]. En modelos murinos de cáncer de pulmón, los resultados son similares [318]. La producción de ácido hialurónico y TGF- β por parte de las células tumorales, constituyen ejemplos de estrategias de evasión inmune vía expresión de *IRAK3*. El ácido hialurónico es reconocido por monocitos y macrófagos (mediante los receptores CD44 y TLR4) [312], iniciando una cascada de señalización que conduce a la producción de TNF α , el cual induce la expresión de *IRAK3* [319], llevando a la tolerancia inmune [312]. Por otra parte, la citoquina TGF- β induce la expresión de *IRAK3*, permitiendo a las células tumorales escapar de la respuesta inmunitaria generada por los macrófagos infiltrantes tumorales. De hecho, estudios *in vitro* han mostrado la sobreexpresión de *IRAK3* en PBMCs humanas tras su exposición a líneas celulares de cáncer de pulmón [318]. En la misma dirección, varios estudios han identificado una expresión alterada de *IRAK3* en pacientes con cáncer. Así, se ha detectado la sobreexpresión de este gen en PBMCs de pacientes con

leucemia mieloide crónica y cáncer gástrico metastásico. Además, dicha sobrerregulación se ha correlacionado con mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón sugiriendo su implicación en el crecimiento tumoral [318, 320].

Obtenido el panel de biomarcadores para PDAC mediante microarrays, la validación de su capacidad diagnóstica se realizó mediante ensayo ciego independiente usando qPCR y empleando 30 muestras nuevas independientes de las anteriores (15 pacientes con PDAC y 15 controles sanos). Nuestros resultados confirmaron la capacidad del grupo de genes para discriminar entre pacientes con PDAC e individuos sanos. Una vez verificado el panel predictor, realizamos un análisis estadístico para determinar la combinación que ofrecía mayor precisión diagnóstica. Los resultados obtenidos demostraron que la pareja formada por *CLEC4D* e *IRAK3* constituía la combinación óptima para diferenciar entre pacientes con PDAC y controles sanos, proporcionando una precisión del 93%, una sensibilidad del 86% y una especificidad del 100%. De acuerdo con estas evidencias, hemos demostrado el impacto que el PDAC tiene sobre las PBMCs de los pacientes, sugiriendo que la exposición de estas células al ambiente tumoral provoca cambios en su perfil de expresión génica que refleja la presencia de la neoplasia. Este hecho, unido a las elevadas tasas de precisión conseguidas con nuestro panel predictor, hace del estudio transcriptómico de PBMCs una herramienta potencial para el diagnóstico de esta enfermedad.

2. Paneles de biomarcadores en PDAC: estudio de distintas plataformas de microarrays

Dado el elevado potencial de la tecnología de microarrays para el descubrimiento de biomarcadores tumorales basados en el perfil de expresión génica, esta metodología se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada en la investigación en cáncer [321]. Esto ha llevado a la existencia de una amplia gama de diferentes plataformas comerciales para este tipo de estudios, sujetas a distintos procesos de fabricación, variación respecto a las

sondas empleadas, deposición o producción de dichas sondas, marcaje, etc. Además, existen numerosas herramientas estadísticas disponibles para el análisis de los resultados. Todo ello, unido a las diferencias en los protocolos experimentales empleados entre laboratorios [322], hace muy difícil la comparación de los resultados de microarrays generados por distintos grupos de investigación, reduciendo la utilidad de los datos disponibles [323]. Por otro lado, la investigación en cáncer puede conllevar tamaños muestrales limitados, como ocurre en el caso del PDAC, cuya baja incidencia hace que muchos de los estudios publicados cuenten con un número bajo de pacientes, lo que puede conducir a resultados dudosos desde el punto de vista estadístico [324]. Estas limitaciones no solo ponen de manifiesto la importancia de la implementación de procedimientos más estandarizados en los experimentos de microarrays, sino que desvelan la necesidad de desarrollar técnicas que hagan plausible la comparación entre distintos estudios.

En este contexto, la integración de datos generados mediante distintas plataformas de microarrays, usando técnicas de metaanálisis, permite mejorar la consistencia y poder estadístico de esta tecnología [325]. Nuestro estudio incluye la comparación de dos conjuntos de datos generados a partir de distintas plataformas de microarrays, con el fin de encontrar genes expresados diferencialmente que puedan constituir biomarcadores potenciales para el diagnóstico de esta enfermedad. Para el primer conjunto de datos utilizamos los resultados obtenidos en el estudio previamente descrito, en el que se empleó la plataforma GeneChip® Human Gene ST 1.0 Arrays de Affymetrix. Para el segundo análisis, contamos con nuevas muestras de pacientes con PDAC y con la misma población de individuos control, empleando la plataforma HumanHT-12® v4 Expression BeadChip de Illumina, para el estudio.

Estas dos plataformas representan dos de las principales tecnologías de microarrays para estudios de expresión génica [326]. Aunque ambas plataformas se basan en el empleo de sondas de oligonucleótidos, varían en su diseño y fabricación. Los chips de Affymetrix incluyen múltiples sondas para cada gen, oligonucleótidos cortos (alrededor de 25 pb) que se sintetizan *in situ* mediante fotolitografía, quedando adheridas a la superficie del chip y ocupando

una localización predefinida [236]. Por el contrario, en el método de producción de los BeadChips de Illumina, la síntesis de las sondas y su adhesión a la matriz se realizan por separado [240]. Además, las sondas se basan en oligonucleótidos largos, estando constituidas por un oligonucleótido de 50pb específico del gen y otro de 23pb que representa la dirección molecular [327]. Una vez sintetizadas, estas sondas se adhieren a pequeñas esferas de tamaño micrométrico, siendo estas últimas las que se disponen sobre la matriz de forma aleatoria [240, 327]. En este caso, las sondas no tienen una disposición específica, por lo que se realiza un paso de decodificación para determinar la ubicación de cada sonda en el microarray [240].

Tras analizar los datos obtenidos a partir de cada una de las plataformas en base a los criterios establecidos (p -value $<0,01$; *fold change* $>1,5$), identificamos como diferencialmente expresados, 64 genes con la plataforma Affymetrix y 150 genes con la tecnología de Illumina. Sin embargo, dadas las diferencias existentes entre ambas tecnologías y entre los procedimientos experimentales seguidos, la comparación directa de estos datos originaría importantes sesgos en los resultados. Para evitarlo, es necesario el empleo de métodos de corrección que permitan integrar adecuadamente los datos de dichas plataformas [325].

Con el objetivo realizar una comparativa adecuada, realizamos un metaanálisis empleando un método de integración que incluyó la corrección del efecto *batch* (lote) y la normalización entre plataformas mediante el método empírico de Bayes (ComBat) [328]. Este último método es muy útil para reducir la varianza entre plataformas y es el recomendado para este tipo de estudios [325], ya que es independiente del tamaño de la muestra y conlleva un bajo coste computacional [329].

Hace más de una década, Grutzman y cols. [324] ya realizaron un metaanálisis en PDAC incluyendo varios conjuntos de datos de expresión génica generados por microarrays, e identificaron casi 570 genes desregulados. Sin embargo, estos autores incluyeron menos de 3.000 genes en su metaanálisis. Recientemente, se han publicado diferentes estudios aplicando técnicas de metaanálisis para identificar diferencias de expresión

génica en el contexto tumoral [330-332]. En este sentido, Goonesekere y cols. [333] realizaron un metaanálisis a partir de varios conjuntos de datos generados por microarrays, con el objetivo de identificar biomarcadores en cáncer de páncreas, aunque su investigación se basó en la identificación de genes expresados diferencialmente determinando estadísticamente la intersección entre los conjuntos de datos. En contraste, en nuestro estudio hemos realizado una rigurosa integración, incluyendo la corrección del efecto *batch* y la normalización entre plataformas. Por otro lado, existen estudios previos que han comparado datos generados a partir de las plataformas de Affymetrix e Illumina [323, 325] aunque ninguno de ellos se ha realizado en el contexto del PDAC.

Una vez integrados todos los datos, conseguimos identificar 5 genes (*FAMI3*, *IRAK3*, *DENND2D*, *PLBD1* y *AGPAT9*) que aparecían como diferencialmente expresados en los tres análisis realizados, es decir, en los estudios individuales con Affymetrix e Illumina y en el metaanálisis. Estos genes se han considerado como candidatos fiables para ser biomarcadores de PDAC, ya que han mostrado una diferencia de expresión significativa en los tres análisis. De hecho, el gen *IRAK3* ya se estudió y validó por qPCR en nuestro estudio previo basado solo en la plataforma Affymetrix [334]. Los otros 3 genes seleccionados del estudio previo con la plataforma Affymetrix, *ANKRD22*, *CLEC4D* y *VNN1*, también se mostraron como diferencialmente expresados en nuestro metaanálisis, aunque no en la plataforma de Illumina.

Un análisis más profundo de nuestros resultados, muestra una disminución en la expresión de los genes *FAIM3/TOSO* y *DENND2D*, siendo el primero de ellos el que se presentó más bajo regulado (-2,17 y -1,67 *folds*, respectivamente). El gen *FAIM3/TOSO* se ha relacionado con la inmunidad innata [335] y adaptativa [336]. De hecho, su expresión se observa principalmente en células inmunes [337], siendo particularmente elevada en linfocitos B (CD19+) y T (CD4+/CD8+) y células NK (CD56+/CD3-) [338]. Este gen codifica para un receptor Fc de inmunoglobulinas (Ig), los cuales median funciones únicas de cada clase [339]. Por otro lado, *FAIM3/TOSO* regula negativamente la apoptosis de linfocitos [340], es decir, su baja expresión

resulta en una elevada apoptosis mientras que el incremento de su expresión, mediante tratamiento con el anticuerpo CD25, protege a las células T de la muerte celular programada [341]. Además, este gen se ha relacionado con la ruta de señalización del receptor del TNF (TNFR) [340] y la activación de granulocitos, monocitos y células dendríticas [342]. Dentro del contexto neoplásico, varios estudios han demostrado una expresión elevada de *FAIM3/TOSO* en células de leucemia linfocítica crónica [338, 343, 344], la cual a su vez se ha relacionado con el pronóstico de la enfermedad [337, 345-347].

Por otra parte, el gen *DENND2D* también se ha relacionado con el sistema inmune como un supresor tumoral [348]. De hecho, las proteínas con dominio DENN presentan una expresión diferencial entre células normales y neoplásica, estando implicadas en la regulación de Rab GTPasas que intervienen en la proliferación, transporte de vesículas y procesos de adhesión y migración de células tumorales [348-350]. *DENND2D* se ha relacionado con la supresión de la carcinogénesis y la proliferación de células de cáncer de pulmón [351, 352]. Una reducción de su expresión ha sido detectada en líneas celulares epiteliales bronquiales inmortalizadas, lesiones precancerosas pulmonares [352] y en varios tipos tumorales, como carcinoma esofágico de células escamosas [348], carcinoma hepatocelular [353], cáncer de pulmón [352] y cáncer gástrico [354]. Además, *DENND2D* se ha incluido en un panel biomarcador para predecir el riesgo de cáncer de mama [355], y su baja expresión se ha propuesto como biomarcador de recurrencia temprana y mal pronóstico en carcinoma hepatocelular [353] y en cáncer gástrico [354].

De los 3 genes (*IRAK3*, *PLBD1* y *AGPAT9*) que aumentaron su expresión en los tres estudios realizados (metaanálisis y los estudios con Affymetrix e Illumina), el primero, *IRAK3*, fue el que presentó mayor expresión (1,84 *folds*). El segundo, *PLBD1*, que aumentó su expresión 1,67 *folds*, codifica para una glicoproteína de función desconocida, observada en neutrófilos [356, 357] y que podría tratarse de una proteína de matriz lisosomal [356]. Este gen se sobreexpresa en otras células inmunes, estando sobrerregulado en sangre total y en PBMCs de pacientes tras ictus isquémico [358]. El tercer gen, *AGPAT9*, el que menos se sobreexpresó (1,58 *folds*), está implicado en el metabolismo de

lípidos, convirtiendo la lisofosfatidilcolina en fosfatidilcolina, uno de los principales fosfolípidos de la membrana celular. En el contexto tumoral, la sobreexpresión de *AGPAT9* conduce a una composición alterada de fosfolípidos, lo que influye en la fluidez de la membrana celular y facilita la proliferación celular y la metastásis [359-361]. Dentro del proceso metastásico, *AGPAT9* parece involucrado en la adaptación al microambiente tumoral mediante dos mecanismos, regulación de hipoxia y metabolismo. Así, este gen participa en la adaptación a la baja disponibilidad de oxígeno, incrementando la expresión de *VEGF* (esencial para la angiogénesis) e influyendo en el metabolismo de la glucosa. Por otro lado, participa en la activación de la vía mTOR, relacionada con el crecimiento tumoral, invasión y metástasis [359]. Este gen se ha encontrado sobreexpresado en distintos tipos tumorales como cáncer de pulmón [362], colorrectal [361], de próstata [363, 364], de mama [365] y carcinoma hepatocelular [360] y se ha relacionado con mal pronóstico, recurrencia y metástasis.

Pero la aplicación de técnicas de metaanálisis a nuestros dos conjuntos de datos no solo mostró genes comunes (con modificación de su expresión) en los tres estudios, sino que nos permitió identificar 28 nuevos genes que no destacaron en los estudios individuales y a los que ahora se les denominó “genes ganados”.

2.1. Metaanálisis: “genes ganados” sobreexpresados en PDAC

El análisis del grupo de “genes ganados” permitió demostrar que entre los que aumentaban su expresión, destacaban los implicados de una u otra forma, en procesos relacionados con la inmunidad, como *CD177*, *S100A12*, *LCN2*, *SLPI* y el gen codificante para la glicoproteína HP, entre otros.

CD177, el gen que mostró la diferencia de expresión más elevada del conjunto de “genes ganados”, codifica un antígeno de neutrófilos, primera línea de defensa en la respuesta inmune innata [366]. En determinadas circunstancias, entre las que se encuentra la patología neoplásica, los neutrófilos son las primeras células en migrar al sitio de inflamación, aumentando su expresión de *CD177* [367]. La interacción entre esta molécula y

PECAM-1, un receptor de señalización y adhesión de la superficie de células endoteliales, media la migración transendotelial de los neutrófilos [366]. Así, se ha descrito la sobreexpresión de *CD177* en pacientes con ciertos tipos de neoplasias hematológicas [368], y se ha propuesto como marcador diagnóstico para algunas de estas patologías [369, 370]. Además, su sobrerregulación se ha asociado con la aparición de eventos gastrointestinales adversos relacionados con la inmunidad durante tratamientos (ej. ipilimumab) [367] y con el cáncer gástrico avanzado [371].

El gen *S100A12*, que codifica para uno de los miembros de la familia de proteínas de unión al calcio S100, también se ha relacionado con la inmunidad innata, expresándose predominantemente en células de origen mieloide, especialmente en neutrófilos. Está implicado en el proceso inflamatorio de varias enfermedades, activando cascadas de señalización intracelulares como MAPK y NF- κ B e induciendo la secreción de citoquinas (como TNF α e IL-1 β) y la expresión de moléculas de adhesión [372, 373]. Su expresión elevada ha sido demostrada en patologías inflamatorias del tipo de la diabetes *mellitus* tipo II [374], enfermedad inflamatoria intestinal [373, 375] y pancreatitis aguda [376, 377]. En el ámbito neoplásico, esta proteína se ha encontrado sobreexpresada en cáncer colorrectal [378], en donde se han detectado altas concentraciones en suero [379].

El gen codificante para *LCN2*, también sobreexpresado en nuestro análisis, está implicado en la inmunidad innata y codifica para una proteína de estrés expresada en condiciones inflamatorias y cáncer que ha sido involucrada en la proliferación y supervivencia de las células tumorales, y en su capacidad metastásica, vía inducción de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) [380]. De hecho, coincidiendo con nuestros resultados, se ha descrito el aumento en la expresión de este gen en varias neoplasias [380, 381], como cáncer colorrectal [382], mamario [381], cervical [383], de ovario [381, 384], tumores de próstata [385] y pancreáticos [386-388], y se ha sugerido que este aumento podría deberse a diferentes estímulos del microambiente tumoral, tales como hipoxia e inflamación [380].

El gen *SLPI* codifica para una proteína inhibidora de la secreción de la proteasa leucocitaria, represora de numerosas proteasas, como la elastasa neutrofilica, catepsina G, tripsina, quimiotripsina, etc. La proteína codificada por este gen está presente en la mayoría de los fluidos de la superficie de las mucosas [389], siendo secretada por distintos tipos celulares, principalmente células endoteliales y aquellas relacionadas con procesos inflamatorios [390]. Su expresión puede ser inducida por varios factores, por ejemplo las citoquinas inflamatorias TNF α e IL-1 β , [391] y juega un papel antiinflamatorio en la respuesta inmune, ya que impide la activación de NF- κ B [389]. Además, SLPI se sobreexpresa en varios tipos de tumores digestivos [390], como en cáncer gástrico [392], pancreático [387] y colorrectal, asociándose en este último con la agresividad tumoral [393] y el potencial metastásico [391, 394]. No obstante, se ha demostrado que la expresión de este gen puede ser beneficiosa o perjudicial para el desarrollo tumoral en función del tipo de cáncer considerado [390].

El gen que codifica para la glicoproteína HP, también se mostró sobrerregulado en los pacientes con PDAC. Esta proteína se encuentra principalmente en el hígado y participa en importantes procesos biológicos. Su función principal es unir y transportar la hemoglobina libre para su degradación en el hígado y reciclaje del hierro, aunque también se ha demostrado que es importante en la estimulación de la angiogénesis [395] y en el sistema inmune, ya que bloquea la activación receptor-ligando por su unión a distintos receptores [396]. En el contexto neoplásico, se ha demostrado una expresión elevada de HP en biopsias de cáncer de ovario [397], y a nivel sérico en pacientes con enfermedades inflamatorias y distintos tipos de neoplasias, incluyendo cáncer pulmón [398, 399]. En la misma línea, se han detectado niveles séricos elevados de HP fucosilada en varios tipos de cáncer, como hepático [400], gástrico, colorrectal y de páncreas, siendo este último el que presentó el incremento más acusado, especialmente en fase avanzada [401, 402].

Por último, otros genes relacionados con la inflamación que se mostraron elevados a través del metaanálisis en PDAC fueron *NLRC4*, *CLEC4E* y *BPI*. El

primero, codifica para una proteína constituyente del inflamosoma, un componente de la inmunidad innata que activa a caspasa-1, lo que conduce a la producción de diversas citoquinas inflamatorias, especialmente IL-1 β e IL-18, las cuales se encuentran elevadas en varios tipos de cáncer. Estas citoquinas pueden facilitar la actividad protumoral desencadenando la secreción de VEGF, FG2 y STAT3, contribuyendo a la supervivencia celular y la metástasis [403, 404]. *CLEC4E*, receptor para la lectina tipo C, está relacionado con la respuesta inmune innata y la inflamación vía activación de NF- κ B [405]. Su expresión se ha relacionado con el PDAC y con los mecanismos de evasión inmune en este tipo tumoral, ya que promueve la supresión inmune adaptativa inducida por macrófagos [406]. Finalmente, *BPI* participa modulando la respuesta inmune adaptativa [407] e innata, ya que codifica para una proteína presente en neutrófilos relacionada con el proceso inflamatorio [408].

No obstante, el metaanálisis también mostró la alteración en la expresión de genes no relacionados con el proceso inflamatorio entre los que debemos destacar *PLSCR1*, *ITGB3*, *MYL9*, *FOLR3*, *SORT1*, *DYSF* y *MS4A*, de los que comentamos los aspectos más relevantes.

El gen *PLSCR1*, que codifica para una proteína de membrana dependiente de calcio [409] que interviene en la translocación de fosfolípidos en la bicapa lipídica de la membrana celular [410], ha sido asociado a proliferación, diferenciación y apoptosis celular en varios tipos de cáncer [409-411]. Determinados factores como EGF y algunas citoquinas pueden inducir su expresión [410]. En particular, este gen participa en diferentes procesos de señalización en cáncer de páncreas [412], y se ha detectado sobreexpresado en cáncer de hígado metastásico [411] y en cáncer colorrectal [409, 413, 410].

El gen *ITGB3* pertenece a la familia de las integrinas, receptores de adhesión que interactúan con la matriz extracelular y que influyen en procesos de supervivencia, proliferación, diferenciación y migración celular. Esta familia de moléculas promueve el crecimiento celular por interacción de las células tumorales con el microambiente y la regulación de los procesos celulares anteriormente mencionados [414]. En particular, *ITGB3* juega un importante papel en el proceso metastásico [415] y la angiogénesis tumoral,

encontrándose un aumento de su expresión en células endoteliales angiogénicas de tumores malignos [416]. Además, se ha relacionado con cáncer colorrectal [414, 417] y con procesos de migración e invasión en esta neoplasia [418]. También pudo ser detectada la sobreexpresión del gen *MYL9*, de la familia de las miosinas, que participan en la formación del citoesqueleto [419]. Este gen muestra diferentes patrones de expresión, detectándose en bajos o altos niveles en cáncer de próstata [420] y pulmón dependiendo del grado tumoral [421] o sobrerregulado en el caso de cáncer gástrico [422].

En nuestro estudio algunos genes relacionados con el metabolismo del folato y con el tráfico vesicular presentaron sobreexpresión en PDAC. La deficiencia de folato se ha asociado con el desarrollo de cáncer de ovario [423, 424] y cáncer de cabeza y cuello, ya que influye en la síntesis, replicación y metilación del ADN [425]. La alteración del gen *FOLR3* en los pacientes con PDAC sugiere una alteración del metabolismo del folato en esta patología. Por otra parte, la desregulación de los genes *SORT1* y *DYSF* puede indicar la importancia del tráfico de vesículas en el desarrollo de este tumor. *SORT1* es un receptor que participa en el tráfico de diferentes proteínas y se ha relacionado con el metabolismo de la glucosa a través de la regulación de insulina [426]. Así, su sobreexpresión conduce a mayor formación de vesículas con Glut4, estimulando la ingesta de glucosa [427]. Se sobreexpresa en pacientes con tumores metastásicos de mama, colorrectal, próstata, pulmón, riñón [428] y en pacientes con cáncer de ovario [429]. No está clara su relación con la apoptosis celular habiéndosele atribuido función proapoptótica y antiapoptótica en líneas celulares [430]. *DYSF* es una proteína localizada en la membrana celular que participa en la reparación y mantenimiento de la membrana de las células musculares. Sin embargo, también se ha detectado en células endoteliales linfáticas y vasculares, en las que podría desarrollar la misma función de reparación y estabilización de la membrana a través de la fusión de vesículas especializadas con la membrana plasmática [431].

Nuestro metaanálisis también identificó dos “genes ganados”, *ANXA3* y *MS4A1*, que mostraron sobre y bajaexpresión, respectivamente, coincidiendo con lo descrito por Baine y cols. [283] en pacientes con PDAC. El primero de

estos genes pertenece a la familia de las anexinas y su sobreexpresión influye en el desarrollo tumoral, metástasis y resistencia a terapia [432] como se ha demostrado en cáncer de hígado [433, 434], ovario [435], cáncer colorrectal [436] y PDAC. Además, se ha mostrado la influencia de este gen en la capacidad metastásica de los cánceres de pulmón e hígado [433, 434, 437], y en la resistencia al tratamiento con análogos de pirimidinas (ej. 5FU, capecitabina) [433, 438], cisplatino [433, 435] e inhibidores de la vía ERBB/RAS (como erlotinib) [438, 439]. Por su parte, *MS4A1* juega un papel clave en la inmunidad [440] ya que codifica para una molécula de superficie de linfocitos B importante en la transducción de señales, proliferación y diferenciación de células B en células plasmáticas [441]. Se ha detectado alterada su expresión en neoplasias hematológicas, como linfoma no Hodgkin [440] y leucemia linfoblástica aguda [442] y en algunos tumores sólidos, como en cáncer colorrectal, en donde ha sido incluido como parte de un panel diagnóstico [443].

2.2. Metaanálisis: “genes ganados” con disminución de la expresión en PDAC

Pero nuestros estudios no sólo han detectado genes sobreexpresados en PDAC. No menos interesante ha sido el panel de genes con disminución de la expresión que también deben ser considerados como potenciales marcadores de la enfermedad. En este sentido, cabe destacar la modulación hallada en la expresión de genes como *GNLY*, *NKG7*, *CLEC2D*, *TXK*, *SH2D1B*, *RASGRP1*, *ST6GAL1*, *SLC38A1* y *VAMP2*, de los que cometamos los aspectos más interesantes.

El gen *GNLY*, uno de los que muestra una mayor disminución de la expresión en PDAC codifica para una proteína en linfocitos T activados y células NK relacionada con la respuesta inmunitaria. Presenta actividad antimicrobiana, una importante acción citotóxica contra células tumorales, activa a las células presentadoras de antígenos y estimula la expresión de varias citoquinas (como IL-1, IL-6, IL-10 e IFN γ), funcionando como quimioatrayente de células inmunes a los sitios de inflamación [444]. Se ha observado que los pacientes con cáncer nasofaríngeo presentan bajos niveles

séricos de GNLY [445]. La baja expresión de GNLY en linfocitos infiltrantes tumorales (TILs) de cáncer colorrectal se correlacionó con metástasis temprana y peor resultado clínico [446]. También se ha sugerido su utilidad como biomarcador en cáncer gástrico [447].

Otro de los genes con disminución de la expresión en pacientes con PDAC es *NKG7*, que codifica para una proteína integral de membrana que se encuentra en los gránulos de células NK, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos. Se ha visto una disminución en su expresión en pacientes con linfoma no Hodgkin [448]. Su expresión se ha correlacionado con la expresión de perforina y granzima en células NK y linfocitos T citotóxicos (y por tanto con la citotoxicidad), con procesos de movilización de los gránulos o la señalización [449] y con un proceso específico desencadenado por la estimulación de las células NK mediante IL-2 [450]. También se ha asociado a apoptosis [451] y diferenciación hacia células Th1 [448]. A pesar de esta relación con la inmunidad, la función específica de este gen sigue siendo desconocida [451].

Un gen de la familia de la lectina tipo C, *CLEC2D*, también apareció alterado en nuestro estudio. Este gen participa tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa [452], expresándose en células NK, células T, monocitos/macrófagos, células dendríticas y células B activadas [453]. Se le atribuye un doble papel en la inmunidad; por un lado, su interacción con CD161 inhibe la activación de las células NK, bloqueando la producción de IFN γ y desencadenando tolerancia inmune. De hecho, su expresión se ha relacionado con el escape inmune en cáncer [454, 455]. Sin embargo, esta interacción tiene efectos opuestos en las células T, influyendo en la respuesta inmune generada por estas células y desencadenando la producción de IFN γ [456].

También el gen *TXK*, miembro de la familia TEC de tirosinas quinasas no receptoras, apareció con baja expresión en PDAC. Este gen participa en la regulación de la inmunidad adaptativa y en el desarrollo, función y diferenciación de células T. Se ha demostrado que la expresión de *TXK*, observada principalmente en células Th1/Th0, conduce a la producción de IFN γ , regulando directamente la producción de citoquinas Th1 [457]. Sin embargo, en el contexto de la polarización hacia células Th1, no están claros

los efectos específicos que provoca su expresión [458]. Por un lado, se ha relacionado estrechamente con células Th1 respecto a la expresión y producción de citoquinas, sin embargo, estudios en modelos murinos sugieren la participación de *TXK* en la diferenciación hacia Th2, como un mecanismo de compensación en ausencia de *ITK*, otro de los miembros de la familia TEC implicado en la diferenciación hacia Th2. Estos resultados contradictorios ponen en duda la participación de este gen exclusivamente en la diferenciación hacia células Th1 [458, 459]. En el mismo sentido, el gen *SH2D1B*, también se encontró modulado. Este gen codifica para una proteína cooperadora en la respuesta inmune, funcionando como adaptador en la señalización de receptores SLAM, una familia de inmunoreceptores que participan tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa. Se ha observado que la expresión de *SH2D1B* activa cascadas de señalización que inducen la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en PBMCs, aumenta la fagocitosis de monocitos/macrófagos, mejora la maduración de células dendríticas, potencia la actividad antitumoral de las células NK y aumenta la presentación de antígenos [460]. Además, hemos identificado una disminución en la expresión de otros genes con un papel muy cuestionado en el desarrollo tumoral. Cabe destacar *RASGRP1*, que codifica para un factor de intercambio de nucleótidos de guanina en Ras que controla la activación de Ras [461]. Este gen se expresa en células T [462], siendo fundamental en el desarrollo de este tipo celular como se ha demostrado en ratones con deficiencias en su expresión [463]. Sin embargo, en el ámbito neoplásico se han visto efectos contrapuestos dependiendo del tumor. Así, mientras *RASGRP1* promueve el desarrollo de leucemia de células T [464] y cáncer de piel [465], se le atribuye una función supresora en cáncer colorrectal [466]. Esto sugiere que el efecto de Ras, generado por *RASGRP1*, puede ser supresor tumoral u oncogénico, dependiendo del contexto neoplásico [466]. En el mismo contexto, el gen *ST6GAL1*, que codifica para una sialiltransferasa, enzima que interviene en procesos de inmunidad [467] y supervivencia celular [468], aparece sobreexpresado en leucemia [469] y tumores de colon [470-472], mama [473] y otros tumores epiteliales [472]. Sin embargo, en los últimos años, se han publicado varios estudios que contradicen estos resultados. Así, investigaciones en cáncer colorrectal [474], de vejiga [475] y gliomas [476],

otorgan a este gen características supresoras tumorales, mostrado bajaexpresión en condiciones neoplásicas [477].

Por último, nuestro estudio ha demostrado una expresión disminuida de los genes *SLC38A1* y *VAMP2*, implicados en el metabolismo de la glucosa. Estos genes se han asociado a cáncer, vía regulación de los niveles de insulina [478]. El primero es un transportador de glutamina el cual induce proliferación de células de cáncer de páncreas [479]. Se ha mostrado sobreexpresado en cáncer de hígado [478, 480] e indica un pobre pronóstico en pacientes con cánceres de mama [481] y gástrico [482]. Cabe destacar que la activación de este gen es necesaria en el contexto inmune dada la necesidad de glutamina en algunos eventos inmunitarios [483]. Por otra parte, la proteína codificada por *VAMP2*, de la familia SNARE, está implicada en el tráfico de vesículas, mediando la fusión entre la membrana vesicular y celular en el proceso de exocitosis. En particular, *VAMP2* se encuentra en la membrana vesicular e interacciona con proteínas SNARE de la membrana celular conduciendo al proceso de exocitosis [484]. Las proteínas SNARE, incluyendo *VAMP2*, regulan la exocitosis en numerosas células inmunes [485], entre las cuales se encuentran neutrófilos [485-487], mastocitos [485, 488], eosinófilos [485, 489], macrófagos [485, 490-492], monocitos [487] y linfocitos [493]. Además, se ha visto la implicación de *VAMP2* y otras proteínas SNARE en la exocitosis de insulina [494]. De hecho, se ha demostrado que *VAMP2* se requiere para la incorporación de las vesículas con *Glut4* a la superficie celular en respuesta a insulina [495].

En conclusión, las variaciones transcriptómicas mostradas en nuestro metaanálisis ponen de manifiesto la alteración de numerosos procesos celulares que tiene lugar en el contexto del PDAC, como pueden ser proliferación y supervivencia, diferenciación, migración, angiogénesis, tráfico vesicular, metabolismo de glucosa y folato, y, muy especialmente, aquellos mecanismos asociados con la inmunidad innata y adaptativa. En este sentido, el estudio del perfil de expresión génica de PBMCs mediante microarrays proporciona, de una forma rápida y precisa, una elevada cantidad de información reflejo de los cambios subyacentes que sufren estas células al

entrar en contacto con el ambiente del PDAC. En esta línea, la integración de distintos conjuntos de datos procedentes de microarrays mediante técnicas de metaanálisis, permite la identificación de posibles biomarcadores génicos con un mayor poder estadístico, siendo esto de especial utilidad en PDAC, en el que su baja frecuencia en la población general conduce a limitados tamaños muestrales en los diferentes estudios.

Como hemos apreciado a lo largo de esta discusión, otros grupos de investigación han relacionado con el desarrollo tumoral muchos de los cambios de expresión observados en este trabajo, lo que apoya el potencial de los microarrays de PBMCs y las técnicas de metaanálisis en el descubrimiento de biomarcadores. Por otra parte, algunos de los genes destacados que hemos visto modificados en PDAC se han propuesto previamente como candidatos potenciales para tratamientos de inmunoterapia antitumoral [437, 442, 460, 496-503], lo que desvela la idoneidad de esta tecnología no sólo en el descubrimiento de biomarcadores diagnósticos o predictivos, sino también en el campo de la inmunoterapia, ya que constituyen una herramienta útil para la identificación de posibles dianas terapéuticas, permitiendo la orientación de las investigaciones de nuevos fármacos en esta área.

3. Biomarcadores de expresión génica y respuesta al tratamiento con erlotinib

Gran parte de los tumores pancreáticos muestran resistencia al tratamiento estándar basado en monoterapia de GEM, lo que ha llevado a la inclusión de otros agentes en el régimen quimioterápico de estos pacientes. Este es el caso de erlotinib (Tarceva®), un inhibidor de EGFR aprobado para el tratamiento de PDAC metastásico, que ayuda a prolongar ligeramente la supervivencia de estos pacientes comparada con la GEM en monoterapia [128]. No obstante, no todos los estudios realizados han mostrado beneficios significativos en la supervivencia de pacientes con PDAC [129], de modo que algunos de ellos son sometidos a este tratamiento con los efectos secundarios que ello conlleva, sin obtener beneficio clínico.

La importancia del desarrollo de SR en la evolución clínica de los pacientes con cáncer que reciben terapia basada en inhibidores de EGFR ha sido objeto de estudio en diferentes tipos de tumores, incluyendo el de ovario [504], cabeza y cuello [505, 506], colorrectal [507] y de pulmón [508, 509]. Moore y cols. [128] realizaron un primer ensayo clínico en fase III, “PA.3”, en el que 282 pacientes con PDAC fueron tratados con terapia combinada de GEM y erlotinib, demostrando que SR se correlacionó con un incremento de la supervivencia global. En este mismo sentido, un análisis global de los estudios en fase III “PA.3” y “BR.21” mostró una asociación entre la presencia y severidad de SR inducida por erlotinib y una mejor evolución clínica en pacientes con PDAC y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) [131]. Curiosamente, los pacientes con NSCLC presentaron asociación entre el beneficio clínico de erlotinib y todos los grados de SR, mientras que en los pacientes con PDAC solo se correlacionó esta mejora con un grado de SR mayor o igual a 2. Del mismo modo, un estudio retrospectivo que incluía pacientes con cáncer de páncreas tratados con GEM y erlotinib demostró mayor supervivencia global en los pacientes que desarrollaron SR severo frente a los que mostraron baja severidad de SR (7,58 vs 5,03 meses, respectivamente) [510].

El mecanismo exacto por el que este tipo de inhibición produce SR no está totalmente claro [134], aunque se ha relacionado con la interferencia en la señalización del crecimiento epidérmico folicular e interfolicular [511]. El gen *EGFR* se expresa constitutivamente en la epidermis, glándulas sebáceas y en el epitelio del folículo piloso [133], siendo una pieza clave en la estimulación del crecimiento epidérmico, el control de la diferenciación, la protección frente al daño ocasionado por la radiación UV, la inhibición de la inflamación y la aceleración en la cicatrización de heridas [511]. Se piensa que la inhibición del EGFR mediante erlotinib produce oclusión folicular y su rotura por la prematura diferenciación epitelial, y la inducción de genes que estimulan la inflamación, la apoptosis y la adherencia celular, situación que, además, podría permitir el crecimiento bacteriano incrementando el daño cutáneo y desarrollo de SR [134]. Se han sugerido diversos factores para intentar explicar la ausencia de SR en algunos pacientes tratados con terapias inhibitoras de EGFR. Entre

ellos destacan las diferencias individuales en la exposición al fármaco, la integridad del sistema inmune y los polimorfismos del EGFR [511]. Considerando la importancia del EGFR en el correcto desarrollo de la piel, la aparición de SR podría ser indicativa del grado de saturación de este receptor y ayudar a predecir la respuesta tumoral o el beneficio clínico en estos pacientes [134].

Aunque varias investigaciones han descrito la asociación entre la presencia y/o grado de SR y el beneficio clínico resultante del tratamiento con erlotinib [128, 132, 508, 512], esta correlación parece ser independiente del estado de *EGFR* respecto a su expresión proteica, número de copias del gen y mutaciones antes del tratamiento [131]. De hecho, se ha demostrado que la expresión de EGFR no predice la efectividad de las terapias inhibitoras de este receptor en cáncer de páncreas [129]. Por tanto, sería muy beneficioso encontrar biomarcadores predictivos que identifiquen qué pacientes podrían beneficiarse de la adición de erlotinib a su régimen de tratamiento. En este sentido, y teniendo en cuenta la demostrada influencia de EGFR en la respuesta inmunitaria, la inflamación y las células sanguíneas tras su bloqueo mediante inhibidores del receptor [513], la sangre periférica constituye una fuente muy interesante para la búsqueda de biomarcadores predictores de la aparición de SR durante la terapia anti-EGFR antes del tratamiento.

Muchos investigadores han identificado diferentes biomarcadores sanguíneos relacionados con la toxicidad en la piel durante este tipo de tratamiento. Así, un estudio con muestras de sangre periférica de pacientes con NSCLC, cáncer de páncreas y colorrectal, tratados con inhibidores de EGFR, identificó diferentes polimorfismos de HLA asociados con una menor probabilidad de desarrollar SR [514]. Además, estos autores han sugerido que la actividad metabólica individual medida por la relación erlotinib/O-desmetil erlotinib en suero, puede emplearse como un biomarcador predictivo de respuesta terapéutica [515]. Recientemente, Arbitrio y cols. [516] detectaron mediante microarrays, ciertos polimorfismos en genes relacionados con adsorción, distribución, metabolismo y excreción, asociados con la presencia de SR. Además, los niveles en suero del factor de crecimiento de hepatocitos,

de la epirregulina y de la anfirregulina en pacientes con cáncer colorrectal, se han correlacionado con la severidad de la toxicidad en la piel causada por la terapia anti-EGFR [517]. En la misma dirección, una baja concentración en suero de la citoquina proinflamatoria IL-8 en pacientes con cáncer tratados con este tipo de terapias, se ha asociado con la severidad de SR y una mayor supervivencia [518].

Dadas las evidencias existentes de la correlación de SR durante el tratamiento con erlotinib y una mayor supervivencia en PDAC [128, 519] y que las variaciones en los patrones de expresión génica de los pacientes se han asociado a modificaciones en el metabolismo, eficacia y toxicidad [520], nuestro siguiente objetivo fue determinar un perfil de expresión génica diferencial en pacientes con PDAC asociado con el desarrollo de SR inducido por erlotinib. Este patrón nos permitiría detectar genes con un papel relevante en el desarrollo de este tipo de toxicidad, permitiendo seleccionar subgrupos de pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de este tratamiento. Para ello, determinamos mediante microarrays el perfil de expresión génica de PBMCs de pacientes con PDAC de forma previa al tratamiento quimioterápico con GEM y erlotinib. Tras la división de los pacientes en un grupo con cualquier grado de desarrollo de SR y otro sin SR, el análisis de los resultados nos permitió identificar 7 genes (*FAM46C*, *IFITM3*, *GMPR*, *DENND6B*, *SELENBP1*, *NOL10* y *SIAH2*) con una disminución significativa de su expresión (≥ 2 folds) en pacientes con SR, y que podrían ser biomarcadores predictivos de la terapia con erlotinib.

La mayor disminución de expresión fue detectada en los genes *FAM46C* y *IFITM3* que intervienen en la vía del IFN [521], la cual ha sido relacionada con la aparición de rash maculopapular en pacientes con esclerosis múltiple [522]. El primero codifica para una proteína estimulada por el IFN tipo 1 y contribuye a la aparición de enfermedades autoinmunes como lupus, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren y diabetes tipo I [523, 524]. Por otro lado, se ha demostrado que la estimulación de las vías de señalización del EGFR, puede conducir a la supresión de la respuesta inmune a través de la inducción de moléculas coinhibidoras, como CTLA-4 y PD-L1 [525]. En este

contexto, la modificación en la expresión de *FAM46C* en PBMCs de pacientes con cáncer observada durante el tratamiento con inmunoterapia anti-CTLA4 [526], sugiere su implicación en la vía de señalización de los puntos de control o *checkpoints* inmunes. La proteína IFITM3, miembro de la familia de proteínas transmembrana inducibles por IFN [527] presente en la mayoría de los tejidos, juega un papel relevante en procesos de adhesión celular, regulación de células inmunes, maduración y migración de células germinales y la mineralización del hueso [528-530]. Existe una estrecha vinculación entre las vías del IFN y la del EGFR, ya que el IFN α puede interferir con EGF afectando a la interacción receptor-ligando y bloqueando su señalización [531]. Además, Mascia y cols. analizaron muestras de plasma de pacientes con cáncer de ovario antes y después del tratamiento con inhibidores de EGFR, encontrando que bajos niveles de mediadores inflamatorios previos al tratamiento estaban asociados con una mayor severidad de SR [532]. El hecho de que los genes *FAM46C* e *IFITM3* inducibles por IFN disminuyan su expresión en los pacientes con PDAC, podría indicar una baja regulación de esta citoquina proinflamatoria antes del tratamiento, lo que se asemeja a los resultados obtenidos por este grupo de investigación. Sin embargo, debemos señalar que estos autores no estudiaron los niveles de IFN antes del tratamiento.

Nuestros resultados también revelaron diferencias de expresión en genes relacionados con las GTPasas, como por ejemplo, *GMPR* y *DENND6B*. El gen *GMPR* codifica para una enzima que cataliza la reducción de guanósín monofosfato (GMP) a inosina monofosfato (IMP) y participa en el reciclaje de las bases intracelulares libres y nucleósidos de purina [533]. Esta proteína ha sido propuesta como un potencial supresor tumoral que inhibe esta vía de regulación en células de melanoma, disminuyendo la cantidad de GTPasas Rho activas y suprimiendo la capacidad invasiva en estas células tumorales [534]. Por otra parte, *DENND6B*, codifica para una proteína con dominio DENN que participa en la regulación de Rab GTPasas. Particularmente, *DENND6B* es un factor de cambio de nucleótidos de guanina implicado en la vía del reciclaje endocítico y en la estabilidad de las uniones adherentes, influyendo en la migración celular [535]. Así, la deficiencia de esta proteína conduce a una

mayor adhesión célula-célula e inhibición de la motilidad celular, influyendo negativamente en la cicatrización [536].

Finalmente, los estudios de array detectaron modificación de la expresión de genes con funciones tan distintas como *NOL10*, *SELENBP1* y *SIAH2* que pasamos a comentar. *NOL10* codifica para una proteína localizada en el nucléolo que parece estar implicada en el ensamblamiento de partículas ribosomales y en el procesamiento del ARN ribosómico (ARNr) [537]. El gen *SELENBP1* pertenece a la familia de las selenoproteínas que median el transporte intracelular de selenio [538], cuya deficiencia se ha asociado con una mayor incidencia de cáncer epitelial [539]. La disminución de la expresión de este gen se ha asociado con varios tipos tumorales y mal pronóstico [540, 541]. Por otra parte, *SELENBP1* se considera importante en la función de los queratinocitos y en el desarrollo de la piel, dada su vinculación con el regulador de adaptación a hipoxia HIF-1 α [541, 542] que mantiene las funciones normales de la piel [542]. Por último, el gen *SIAH2* codificada para un miembro de la familia de proteínas SIAH que son ligasas E3 encargadas de la ubiquitinación y subsecuente degradación proteosomal de proteínas diana. Su activación desencadena la destrucción de proteínas anti y proapoptóticas, de regulación de la transcripción y de superficie celular, por lo que parece implicada en numerosos eventos celulares. En el contexto del cáncer, algunos estudios le otorgan propiedades protumorales [543, 544] como en cáncer de pulmón [545], ovario [546], próstata [547] y mama [548], habiéndose propuesto como biomarcador en cáncer de páncreas [549], pero también antitumorales dado que puede dirigir la degradación proteosomal de varios oncogenes [543]. Por otra parte, *SIAH2* también se ha vinculado a la respuesta celular bajo condiciones de hipoxia [550, 551] y por tanto al correcto desarrollo de la piel. Así, las deficiencias en *SIAH2* conducen a bajos niveles de HIF-1 α en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, lo que lleva a defectos en la cicatrización de heridas, sugiriendo que *SIAH2* es un regulador positivo en la respuesta a la cicatrización [552]. Por último, *SIAH2* se ha relacionado con la vía del EGFR observándose una correlación inversa entre la expresión de *SIAH2* y EGFR en cáncer de mama, y se ha sugerido que la baja expresión de este gen podría ser indicativa de que la vía del EGFR está activa [553].

En conclusión, los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren una diferente susceptibilidad al desarrollo de SR entre los pacientes con PDAC tratados con un régimen terapéutico que incluye erlotinib, la cual, puede ser evaluable mediante la determinación del perfil de expresión génica de PBMCs de los pacientes. Entre las diferencias transcriptómicas destacan genes relacionados con procesos de respuesta a hipoxia, regulación, migración y señalización celular, cuya disminución de expresión se ha correlacionado con la aparición de este tipo de toxicidad cutánea y que podrían constituir un panel biomarcador predictivo de la respuesta a erlotinib en estos pacientes. No obstante, será necesario validar estos biomarcadores mediante qPCR y determinar su especificidad y sensibilidad predictivas de la respuesta de los pacientes al tratamiento.

Conclusiones

VIII. CONCLUSIONES

1. Los estudios de microarrays de las PBMCs de pacientes con PDAC han permitido demostrar la existencia de 87 genes con expresión diferencial en relación a muestras de sujetos sanos.
2. Los estudios mediante qPCR nos han permitido validar un panel de 4 genes denominados *ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1* e *IRAK3* que presentan diferencias significativas de expresión entre pacientes con PDAC y sujetos sanos y que podría ser útil en el diagnóstico de la enfermedad.
3. Los cambios de expresión de los genes seleccionados consistieron, en todos los casos, en una sobreexpresión, encontrándose la mayor diferencia de expresión en relación a los sujetos control en el gen *ANKRD22* (3.26 *folds*).
4. Los estudios de validación ciega demostraron que, de las combinaciones posibles, la asociación de *CLEC4D* e *IRAK3* se correlaciona con el diagnóstico de PDAC con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 100%.
5. La aplicación de un metaanálisis basado en una metodología Bayesiana empírica ha permitido integrar satisfactoriamente los conjuntos de datos obtenidos mediante las plataformas de microarrays Affymetrix e Illumina.
6. Los resultados del metaanálisis permitieron detectar un nuevo panel de cinco genes (*FAIM3*, *IRAK3*, *DENND2D*, *PLBD1* y *AGPAT9*) que fueron compartidos en todos los estudios (Affymetrix, Illumina y metaanálisis integrado) y que presentan una expresión diferencial significativa entre pacientes con PDAC y sujetos sanos.
7. El metaanálisis permitió detectar 28 nuevos genes (“genes ganados”) con expresión diferencial en pacientes con PDAC, que no fueron detectados mediante el uso individual de las plataformas de microarrays, y que pueden ser relevantes para el diagnóstico de pacientes con PDAC.

CONCLUSIONES

8. Los estudios de desarrollo de erupción cutánea (SR) en pacientes con PDAC tratados con erlotinib demuestran la existencia de un perfil específico de expresión génica basado en los genes *FAM46C*, *IFITM3*, *GMPR*, *DENND6B*, *SELENBP1*, *NOL10* y *SIAH2* que podría ser utilizado como indicador predictivo de la respuesta a erlotinib en estos pacientes.

9. Analizadas las funciones de los genes que presentan expresión diferencial en pacientes con PDAC, se puede afirmar que el conocimiento de las principales rutas inmunológicas implicadas en el establecimiento y desarrollo de esta patología es esencial para el estudio de biomarcadores y su posible aplicación como dianas inmunoterapéuticas.

Conclusions

IX. CONCLUSIONS

1. Microarray studies identified 87 genes differentially expressed in peripheral blood samples from PDAC patients compared to healthy subjects.
2. Studies by qPCR have allowed to validate a panel constituted by 4 genes (*ANKRD22*, *CLEC4D*, *VNN1* and *IRAK3*) differentially expressed between PDAC patients and healthy subjects that could be useful for PDAC diagnosis.
3. All 4 selected genes were upregulated, of which *ANKRD22* showed the largest expression difference (3.26 *fold*s) compared to control individuals.
4. In our blinded validation study, the combination of *CLEC4D* and *IRAK3* predicted the diagnosis of PDAC with a sensitivity of 86% and specificity of 100%.
5. The meta-analysis based on an empirical Bayesian methodology have allowed the integration of the datasets obtained from two different microarray platforms, namely Affymetrix and Illumina.
6. Results obtained by our integrative meta-analysis allowed to detect a new biomarker panel constituted by 5 differentially expressed genes (*FAIM3*, *IRAK3*, *DENND2D*, *PLBD1* and *AGPAT9*) between PDAC patients and healthy subjects, which were commonly identified within all analyses (Affymetrix, Illumina and integrative meta-analysis).
7. The meta-analysis allowed to detect 28 novel differentially expressed genes (“gained genes”) in PDAC patients that were not reported by the individual analyses and which could be relevant for PDAC diagnosis.
8. Studies of skin rash development in PDAC patients treated with erlotinib demonstrated the existence of a gene expression profiling based on *FAM46C*, *IFITM3*, *GMPR*, *DENND6B*, *SELENBP1*, *NOL10* and *SIAH2* genes, which could be used as predictive indicator for erlotinib response in these patients.

CONCLUSIONS

9. After analysis of the genes that showed differential expression in patients with PDAC, it can be affirmed that the knowledge of the main immunological pathways involved in the establishment and development of this pathology is essential for the study of biomarkers and their possible application as immunotherapeutic targets.

Bibliografía

X. BIBLIOGRAFÍA

1. EA P. Pró EA. Anatomía Clínica. 1ª edición. Argentina: Medica Panamericana. 2012 (formato digital).
2. Grapin-Botton A. Ductal cells of the pancreas. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(3):504-10. Epub 2004/12/25.
3. Sastre J, Sabater L, Aparisi L. [Physiology of pancreatic secretion]. *Gastroenterología y hepatología*. 2005;28 Suppl 2:3-9. Fisiología de la secreción pancreática.
4. Vinik A RL, Pittenger GL, Taylor-Fishwick D. Stimulation of pancreatic islet neogenesis: a possible treatment for type 1 and type 2 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes*. 2004;11:125-40.
5. American Cancer Society. Pancreatic cancer detailed guide. American Cancer Society Atlanta, GA. [Accessed on: 2016 August 10]. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/>
6. Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press: Lyon 2000.
7. Hackeng WM, Hruban RH, Offerhaus GJ, Brosens LA. Surgical and molecular pathology of pancreatic neoplasms. *Diagnostic pathology*. 2016;11(1):47. Epub 2016/06/09.
8. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*. 2010;39(6):707-12. Epub 2010/07/29.
9. Basturk O CI, Adsay NV. Pathologic Classification and Biological Behavior of Pancreatic Neoplasia. In: Neoptolemos JP UR, Abbruzzese JL, Büchler MW, editor. *Pancreatic Cancer*. Springer Science+Business Media: New York, NY (USA); 2010. p. 39-70.
10. Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Lohr JM, Neoptolemos J, et al. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatology*. 2015;15(1):8-18. Epub 2014/12/31.
11. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2016;388(10039):73-85. Epub 2016/02/03.
12. Hruban RH, Fukushima N. Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2007;20 Suppl 1:S61-70. Epub 2007/05/09.

13. Erkan M, Michalski CW, Rieder S, Reiser-Erkan C, Abiatari I, Kolb A, et al. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2008;6(10):1155-61. Epub 2008/07/22.
14. Mollenhauer J, Roether I, Kern HF. Distribution of extracellular matrix proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and its influence on tumor cell proliferation in vitro. *Pancreas*. 1987;2(1):14-24. Epub 1987/01/01.
15. Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, Fingerle AA, Dobritz M, Kleeff J, et al. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(8):454-67. Epub 2012/06/20.
16. Stark A EG. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. In: *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2015. Doi: 10.3998/panc.2015.14.
17. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebécque A, Burtin P, Goere D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26 Suppl 5:v56-68. Epub 2015/09/01.
18. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). [Accesed on: 2016 August 11]. Available from: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdepancreas/Paginas/Incidencia.aspx>
19. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Accessed on August 12, 2016.
20. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016;66(1):7-30. Epub 2016/01/09.
21. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(8):1650-6. Epub 2014/04/25.
22. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta: American Cancer Society; 2016.
23. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer research*. 2014;74(11):2913-21. Epub 2014/05/21.

24. Yeo TP. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Seminars in oncology*. 2015;42(1):8-18. Epub 2015/03/03.
25. Kim VM, Ahuja N. Early detection of pancreatic cancer. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*. 2015;27(4):321-31. Epub 2015/09/12.
26. Yu J, Blackford AL, Dal Molin M, Wolfgang CL, Goggins M. Time to progression of pancreatic ductal adenocarcinoma from low-to-high tumour stages. *Gut*. 2015;64(11):1783-9. Epub 2015/02/01.
27. Wolff RA AJ, Evans DB. Epidemiology. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
28. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1252-61. Epub 2013/04/30.
29. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*. 2008;393(4):535-45. Epub 2008/01/15.
30. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC: AICR, 2007, pp. 271–274.
31. Nkondjock A, Krewski D, Johnson KC, Ghadirian P. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer. *International journal of cancer*. 2005;114(5):817-23. Epub 2004/12/21.
32. Silverman DT. Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*. 2001;21(1):7-25. Epub 2001/01/03.
33. Silverman DT, Brown LM, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, et al. Alcohol and pancreatic cancer in blacks and whites in the United States. *Cancer research*. 1995;55(21):4899-905. Epub 1995/11/01.
34. Isaksson B, Jonsson F, Pedersen NL, Larsson J, Feychting M, Permert J. Lifestyle factors and pancreatic cancer risk: a cohort study from the Swedish Twin Registry. *International journal of cancer*. 2002;98(3):480-2. Epub 2002/03/29.
35. Lin Y, Kikuchi S, Tamakoshi A, Yagyu K, Obata Y, Inaba Y, et al. Dietary habits and pancreatic cancer risk in a cohort of middle-aged and elderly Japanese. *Nutrition and cancer*. 2006;56(1):40-9. Epub 2006/12/21.
36. Ye W, Lagergren J, Weiderpass E, Nyren O, Adami HO, Ekblom A. Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut*. 2002;51(2):236-9. Epub 2002/07/16.

37. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, et al. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *The American journal of gastroenterology*. 2007;102(12):2696-707. Epub 2007/09/04.
38. Inoue M, Tajima K, Takezaki T, Hamajima N, Hirose K, Ito H, et al. Epidemiology of pancreatic cancer in Japan: a nested case-control study from the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC). *International journal of epidemiology*. 2003;32(2):257-62. Epub 2003/04/26.
39. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(3):765-76. Epub 2009/03/05.
40. Lu XH, Wang L, Li H, Qian JM, Deng RX, Zhou L. Establishment of risk model for pancreatic cancer in Chinese Han population. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(14):2229-34. Epub 2006/04/13.
41. Spanier BW, Dijkgraaf MG, Bruno MJ. Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2008;22(1):45-63. Epub 2008/01/22.
42. van de Wiel A. Diabetes mellitus and alcohol. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2004;20(4):263-7. Epub 2004/07/14.
43. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *International Pancreatitis Study Group. The New England journal of medicine*. 1993;328(20):1433-7. Epub 1993/05/20.
44. Donaldson MS. Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition journal*. 2004;3:19. Epub 2004/10/22.
45. La Vecchia C. Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk. *Nutrition reviews*. 2009;67 Suppl 1:S126-9. Epub 2009/07/02.
46. Nothlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(19):1458-65. Epub 2005/10/06.
47. Larsson SC, Wolk A. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *British journal of cancer*. 2012;106(3):603-7. Epub 2012/01/14.
48. Casari I, Falasca M. Diet and Pancreatic Cancer Prevention. *Cancers*. 2015;7(4):2309-17. Epub 2015/11/28.

49. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Lankisch PG. Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. *Gastroenterology clinics of North America*. 1999;28(3):673-85. x. Epub 1999/09/30.
50. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2010;24(3):349-58. Epub 2010/06/01.
51. Talamini G, Bassi C, Falconi M, Sartori N, Pasetto M, Salvia R, et al. Early detection of pancreatic cancer following the diagnosis of chronic pancreatitis. *Digestion*. 1999;60(6):554-61. Epub 1999/11/05.
52. Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu K, Colangelo L, Dyer A. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *Jama*. 2000;283(19):2552-8. Epub 2000/05/18.
53. Gapstur SM, Gann P. Is pancreatic cancer a preventable disease? *Jama*. 2001;286(8):967-8. Epub 2001/08/31.
54. Stevens RJ, Roddam AW, Beral V. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *British journal of cancer*. 2007;96(3):507-9. Epub 2007/01/17.
55. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *Jama*. 1995;273(20):1605-9. Epub 1995/05/24.
56. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British journal of cancer*. 2005;92(11):2076-83. Epub 2005/05/12.
57. Pannala R, Leirness JB, Bamlet WR, Basu A, Petersen GM, Chari ST. Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Gastroenterology*. 2008;134(4):981-7. Epub 2008/04/09.
58. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Timmons LJ, Ransom J, de Andrade M, et al. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(1):95-101. Epub 2007/12/07.
59. Jacobs EJ, Chanock SJ, Fuchs CS, Lacroix A, McWilliams RR, Steplowski E, et al. Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *International journal of cancer*. 2010;127(6):1421-8. Epub 2010/01/06.
60. Bartsch DK, Gress TM, Langer P. Familial pancreatic cancer--current knowledge. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(8):445-53. Epub 2012/06/06.

61. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, et al. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(6):424-31. Epub 2009/03/12.
62. Ojajarvi IA, Partanen TJ, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, et al. Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occupational and environmental medicine*. 2000;57(5):316-24. Epub 2000/04/19.
63. Paulson AS, Tran Cao HS, Tempero MA, Lowy AM. Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1316-26. Epub 2013/04/30.
64. Wong JC, Lu DS. Staging of pancreatic adenocarcinoma by imaging studies. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2008;6(12):1301-8. Epub 2008/10/25.
65. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;362(17):1605-17. Epub 2010/04/30.
66. Keane MG, Horsfall L, Rait G, Pereira SP. A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ open*. 2014;4(11):e005720. Epub 2014/11/21.
67. Li J, Li Y, Cao G, Guo K, Zhang L, Ma Q. Early manifestations of pancreatic cancer: the effect of cancer-nerve interaction. *Medical hypotheses*. 2013;81(2):180-2. Epub 2013/06/12.
68. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *The New England journal of medicine*. 2014;371(22):2140-1. Epub 2014/11/27.
69. Lee ES, Lee JM. Imaging diagnosis of pancreatic cancer: a state-of-the-art review. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(24):7864-77. Epub 2014/07/01.
70. Lu DS, Vedantham S, Krasny RM, Kadell B, Berger WL, Reber HA. Two-phase helical CT for pancreatic tumors: pancreatic versus hepatic phase enhancement of tumor, pancreas, and vascular structures. *Radiology*. 1996;199(3):697-701. Epub 1996/06/01.
71. Schima W, Ba-Ssalamah A, Kolblinger C, Kulinna-Cosentini C, Puespoek A, Gotzinger P. Pancreatic adenocarcinoma. *European radiology*. 2007;17(3):638-49. Epub 2006/10/06.
72. Wong JC, Raman S. Surgical resectability of pancreatic adenocarcinoma: CTA. *Abdominal imaging*. 2010;35(4):471-80. Epub 2009/05/27.
73. Long EE, Van Dam J, Weinstein S, Jeffrey B, Desser T, Norton JA. Computed tomography, endoscopic, laparoscopic, and intra-operative sonography for assessing resectability of pancreatic cancer. *Surgical oncology*. 2005;14(2):105-13. Epub 2005/08/30.

74. Miura F, Takada T, Amano H, Yoshida M, Furui S, Takeshita K. Diagnosis of pancreatic cancer. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2006;8(5):337-42. Epub 2008/03/12.
75. Bipat S, Phoa SS, van Delden OM, Bossuyt PM, Gouma DJ, Lameris JS, et al. Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis and determining resectability of pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *Journal of computer assisted tomography*. 2005;29(4):438-45. Epub 2005/07/14.
76. Nawaz H, Fan CY, Kloke J, Khalid A, McGrath K, Landsittel D, et al. Performance characteristics of endoscopic ultrasound in the staging of pancreatic cancer: a meta-analysis. *JOP : Journal of the pancreas*. 2013;14(5):484-97. Epub 2013/09/11.
77. Conroy T, Bachet JB, Ayav A, Huguet F, Lambert A, Caramella C, et al. Current standards and new innovative approaches for treatment of pancreatic cancer. *Eur J Cancer*. 2016;57:10-22. Epub 2016/02/07.
78. Fuzery AK, Levin J, Chan MM, Chan DW. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clinical proteomics*. 2013;10(1):13. Epub 2013/10/04.
79. Sharma S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*. 2009;30(1):1-8. Epub 2009/01/01.
80. Bialecki ES, Di Bisceglie AM. Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2005;7(1):26-34. Epub 2008/03/12.
81. Sorensen SS, Mosgaard BJ. Combination of cancer antigen 125 and carcinoembryonic antigen can improve ovarian cancer diagnosis. *Danish medical bulletin*. 2011;58(11):A4331. Epub 2011/11/04.
82. Kim HJ, Kim MH, Myung SJ, Lim BC, Park ET, Yoo KS, et al. A new strategy for the application of CA19-9 in the differentiation of pancreaticobiliary cancer: analysis using a receiver operating characteristic curve. *The American journal of gastroenterology*. 1999;94(7):1941-6. Epub 1999/07/16.
83. Bond-Smith G, Banga N, Hammond TM, Imber CJ. Pancreatic adenocarcinoma. *BMJ*. 2012;344:e2476.
84. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(33):5313-27. Epub 2006/10/25.

85. Ansari D, Gustafsson A, Andersson R. Update on the management of pancreatic cancer: surgery is not enough. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(11):3157-65. Epub 2015/03/26.

86. Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *The American journal of gastroenterology*. 1990;85(4):350-5. Epub 1990/04/01.

87. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2007;33(3):266-70. Epub 2006/11/14.

88. Boone BA, Steve J, Zenati MS, Hogg ME, Singhi AD, Bartlett DL, et al. Serum CA 19-9 response to neoadjuvant therapy is associated with outcome in pancreatic adenocarcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2014;21(13):4351-8. Epub 2014/08/06.

89. Katz MH, Varadhachary GR, Fleming JB, Wolff RA, Lee JE, Pisters PW, et al. Serum CA 19-9 as a marker of resectability and survival in patients with potentially resectable pancreatic cancer treated with neoadjuvant chemoradiation. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(7):1794-801. Epub 2010/02/18.

90. Aldakkak M, Christians KK, Krepline AN, George B, Ritch PS, Erickson BA, et al. Pre-treatment carbohydrate antigen 19-9 does not predict the response to neoadjuvant therapy in patients with localized pancreatic cancer. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2015;17(10):942-52. Epub 2015/08/11.

91. Winter JM, Yeo CJ, Brody JR. Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer. *Journal of surgical oncology*. 2013;107(1):15-22. Epub 2012/06/26.

92. Byrd DR, Edge S, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, Springer, 2010.

93. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Ritchey J, Stewart AK, Winchester DP, et al. Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer*. 2007;110(4):738-44. Epub 2007/06/21.

94. Vauthey JN, Dixon E. AHPBA/SSO/SSAT Consensus Conference on Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: rationale and overview of the conference. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(7):1725-6. Epub 2009/04/28.

95. Ansari D, Williamsson C, Tingstedt B, Andersson B, Lindell G, Andersson R. Pancreaticoduodenectomy--the transition from a low- to a high-volume center. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2014;49(4):481-4. Epub 2013/11/22.

96. Begg CB, Cramer LD, Hoskins WJ, Brennan MF. Impact of hospital volume on operative mortality for major cancer surgery. *Jama*. 1998;280(20):1747-51. Epub 1998/12/08.
97. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011;378(9791):607-20. Epub 2011/05/31.
98. Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, et al. Recent progress in pancreatic cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(5):318-48. Epub 2013/07/17.
99. Ozawa F, Friess H, Kunzli B, Shrikhande SV, Otani T, Makuuchi M, et al. Treatment of pancreatic cancer: the role of surgery. *Dig Dis*. 2001;19(1):47-56. Epub 2001/06/01.
100. Donahue TR, Reber HA. Surgical management of pancreatic cancer--pancreaticoduodenectomy. *Seminars in oncology*. 2015;42(1):98-109. Epub 2015/03/03.
101. Weledji EP, Enoworock G, Mokake M, Sinju M. How Grim is Pancreatic Cancer? *Oncology reviews*. 2016;10(1):294. Epub 2016/07/30.
102. Parikh PY, Lillemoe KD. Surgical management of pancreatic cancer--distal pancreatectomy. *Seminars in oncology*. 2015;42(1):110-22. Epub 2015/03/03.
103. Navarro S, Vaquero E, Maurel J, Bombi JA, De Juan C, Feliu J, et al. [Recommendations for diagnosis, staging and treatment of pancreatic cancer (Part II)]. *Medicina clinica*. 2010;134(15):692-702. Epub 2010/04/02. Recomendaciones para el diagnostico, estadificacion y tratamiento del cancer de pancreas (parte II).
104. Fung MC, Takayama S, Ishiguro H, Sakata T, Adachi S, Morizane T. [Chemotherapy for advanced or metastatic pancreatic cancer: analysis of 43 randomized trials in 3 decades (1974-2002)]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy*. 2003;30(8):1101-11. Epub 2003/08/27.
105. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(6):2403-13. Epub 1997/06/01.
106. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(12):1200-10. Epub 2004/03/19.
107. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing

curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama*. 2007;297(3):267-77. Epub 2007/01/18.

108. Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, Yamamoto J, Nakao A, Egawa S, et al. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *British journal of cancer*. 2009;101(6):908-15. Epub 2009/08/20.

109. 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;310(14):1473-81. Epub 2013/10/10.

110. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, et al. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001;358(9293):1576-85. Epub 2001/11/22.

111. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *Jama*. 2010;304(10):1073-81. Epub 2010/09/09.

112. Lutfi W, Talamonti MS, Kantor O, Wang CH, Liederbach E, Stocker SJ, et al. Perioperative chemotherapy is associated with a survival advantage in early stage adenocarcinoma of the pancreatic head. *Surgery*. 2016;160(3):714-24. Epub 2016/07/17.

113. Andersson R, Aho U, Nilsson BI, Peters GJ, Pastor-Anglada M, Rasch W, et al. Gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer: molecular mechanisms and potential solutions. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2009;44(7):782-6. Epub 2009/02/14.

114. Oettle H, Neuhaus P. Adjuvant therapy in pancreatic cancer: a critical appraisal. *Drugs*. 2007;67(16):2293-310. Epub 2007/11/07.

115. Renouf D, Moore M. Evolution of systemic therapy for advanced pancreatic cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2010;10(4):529-40. Epub 2010/04/20.

116. 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 : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(33):5513-8. Epub 2009/10/28.

117. Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, Andre T, et al. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase

III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(15):3509-16. Epub 2005/05/24.

118. Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F, Gonnermann M, Schonekas H, Rost A, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(24):3946-52. Epub 2006/08/22.

119. Di Marco M, Di Cicilia R, Macchini M, Nobili E, Vecchiarelli S, Brandi G, et al. Metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the best standard treatment? (Review). *Oncology reports*. 2010;23(5):1183-92. Epub 2010/04/08.

120. Sun C, Ansari D, Andersson R, Wu DQ. Does gemcitabine-based combination therapy improve the prognosis of unresectable pancreatic cancer? *World journal of gastroenterology*. 2012;18(35):4944-58. Epub 2012/09/25.

121. Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, et al. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(34):4548-54. Epub 2011/10/05.

122. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England journal of medicine*. 2013;369(18):1691-703. Epub 2013/10/18.

123. Hartlapp I, Muller J, Kenn W, Steger U, Isbert C, Scheurlen M, et al. Complete pathological remission of locally advanced, unresectable pancreatic cancer (LAPC) after intensified neoadjuvant chemotherapy. *Onkologie*. 2013;36(3):123-5. Epub 2013/03/15.

124. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(4):689-708. Epub 2004/12/23.

125. Troiani T, Martinelli E, Capasso A, Morgillo F, Orditura M, De Vita F, et al. Targeting EGFR in pancreatic cancer treatment. *Current drug targets*. 2012;13(6):802-10. Epub 2012/03/31.

126. Faller BA, Burtness B. Treatment of pancreatic cancer with epidermal growth factor receptor-targeted therapy. *Biologics : targets & therapy*. 2009;3:419-28. Epub 2009/09/24.

127. Nedaeinia R, Avan A, Manian M, Salehi R, Ghayour-Mobarhan M. EGFR as a potential target for the treatment of pancreatic cancer: dilemma and controversies. *Current drug targets*. 2014;15(14):1293-301. Epub 2014/11/28.

128. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced

pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(15):1960-6. Epub 2007/04/25.

129. Philip PA, Lutz MP. Targeting Epidermal Growth Factor Receptor-Related Signaling Pathways in Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2015;44(7):1046-52. Epub 2015/09/12.

130. Lacouture ME. Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(10):803-12. Epub 2006/09/23.

131. Wacker B, Nagrani T, Weinberg J, Witt K, Clark G, Cagnoni PJ. Correlation between development of rash and efficacy in patients treated with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in two large phase III studies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(13):3913-21. Epub 2007/07/04.

132. Heinemann V, Vehling-Kaiser U, Waldschmidt D, Kettner E, Marten A, Winkelmann C, et al. Gemcitabine plus erlotinib followed by capecitabine versus capecitabine plus erlotinib followed by gemcitabine in advanced pancreatic cancer: final results of a randomised phase 3 trial of the 'Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie' (AIO-PK0104). *Gut*. 2013;62(5):751-9. Epub 2012/07/10.

133. Perez-Soler R, Van Cutsem E. Clinical research of EGFR inhibitors and related dermatologic toxicities. *Oncology (Williston Park)*. 2007;21(11 Suppl 5):10-6. Epub 2007/12/25.

134. Melosky B, Burkes R, Rayson D, Alcindor T, Shear N, Lacouture M. Management of skin rash during EGFR-targeted monoclonal antibody treatment for gastrointestinal malignancies: Canadian recommendations. *Curr Oncol*. 2009;16(1):16-26. Epub 2009/02/21.

135. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;364(19):1817-25. Epub 2011/05/13.

136. 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. *Lancet*. 2016;387(10018):545-57. Epub 2015/11/30.

137. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Guidelines for patients. Version 1.2014 Pancreatic cancer. 2014.

138. Franke AJ, Rosati LM, Pawlik TM, Kumar R, Herman JM. The role of radiation therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma in the neoadjuvant and adjuvant settings. *Seminars in oncology*. 2015;42(1):144-62. Epub 2015/03/03.

139. Narang AK, Herman JM. The promise of modern radiotherapy in resected pancreatic adenocarcinoma: a response to Bekaii-Saab et al. *Annals of surgical oncology*. 2014;21(4):1064-6. Epub 2014/02/14.

140. Huguet F, Girard N, Guerche CS, Hennequin C, Mornex F, Azria D. Chemoradiotherapy in the management of locally advanced pancreatic carcinoma: a qualitative systematic review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(13):2269-77. Epub 2009/03/25.

141. Brunner TB. Neoadjuvant therapy for potentially resectable pancreatic cancer: an emerging paradigm? *Current oncology reports*. 2013;15(2):162-9. Epub 2013/01/18.

142. Xu CP, Xue XJ, Liang N, Xu DG, Liu FJ, Yu XS, et al. Effect of chemoradiotherapy and neoadjuvant chemoradiotherapy in resectable pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2014;140(4):549-59. Epub 2013/12/29.

143. Piperdi M, McDade TP, Shim JK, Piperdi B, Kadish SP, Sullivan ME, et al. A neoadjuvant strategy for pancreatic adenocarcinoma increases the likelihood of receiving all components of care: lessons from a single-institution database. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2010;12(3):204-10. Epub 2010/07/02.

144. Pingpank JF, Hoffman JP, Ross EA, Cooper HS, Meropol NJ, Freedman G, et al. Effect of preoperative chemoradiotherapy on surgical margin status of resected adenocarcinoma of the head of the pancreas. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2001;5(2):121-30. Epub 2001/05/02.

145. Talamonti MS, Small W, Jr., Mulcahy MF, Wayne JD, Attaluri V, Colletti LM, et al. A multi-institutional phase II trial of preoperative full-dose gemcitabine and concurrent radiation for patients with potentially resectable pancreatic carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2006;13(2):150-8. Epub 2006/01/19.

146. Bittoni A, Santoni M, Lanese A, Pellei C, Andrikou K, Stefano C. Neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: an emerging strategy. *Gastroenterology research and practice*. 2014;2014:183852. Epub 2014/08/08.

147. Kalsner MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg*. 1985;120(8):899-903. Epub 1985/08/01.

148. Yeo CJ, Abrams RA, Grochow LB, Sohn TA, Ord SE, Hruban RH, et al. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: postoperative adjuvant

chemoradiation improves survival. A prospective, single-institution experience. *Annals of surgery*. 1997;225(5):621-33; discussion 33-6. Epub 1997/05/01.

149. Hsu CC, Herman JM, Corsini MM, Winter JM, Callister MD, Haddock MG, et al. Adjuvant chemoradiation for pancreatic adenocarcinoma: the Johns Hopkins Hospital-Mayo Clinic collaborative study. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(4):981-90. Epub 2010/01/21.

150. Loehrer PJ, Sr., Feng Y, Cardenes H, Wagner L, Brell JM, Cella D, et al. Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(31):4105-12. Epub 2011/10/05.

151. Philip PA. Locally advanced pancreatic cancer: where should we go from here? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(31):4066-8. Epub 2011/10/05.

152. Klinkenbijn JH, Jeekel J, Sahmoud T, van Pel R, Couvreur ML, Veenhof CH, et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Annals of surgery*. 1999;230(6):776-82; discussion 82-4. Epub 2000/01/01.

153. Smeenk HG, van Eijck CH, Hop WC, Erdmann J, Tran KC, Debois M, et al. Long-term survival and metastatic pattern of pancreatic and periampullary cancer after adjuvant chemoradiation or observation: long-term results of EORTC trial 40891. *Annals of surgery*. 2007;246(5):734-40. Epub 2007/10/31.

154. Hammel P, Huguet F, van Laethem JL, Goldstein D, Glimelius B, Artru P, et al. Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *Jama*. 2016;315(17):1844-53. Epub 2016/05/04.

155. Glimelius B, Hoffman K, Sjoden PO, Jacobsson G, Sellstrom H, Enander LK, et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 1996;7(6):593-600. Epub 1996/08/01.

156. Engelhardt K, Riley C, Cooke L, Mahadevan D. Monoclonal antibody therapies targeting pancreatic ductal adenocarcinoma. *Current drug discovery technologies*. 2006;3(4):231-43. Epub 2007/04/14.

157. Macgregor-Das AM, Iacobuzio-Donahue CA. Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. *Journal of surgical oncology*. 2013;107(1):8-14. Epub 2012/07/19.
158. Murphy SJ, Hart SN, Lima JF, Kipp BR, Klebig M, Winters JL, et al. Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. *Gastroenterology*. 2013;145(5):1098-109 e1. Epub 2013/08/06.
159. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine*. 1988;319(9):525-32. Epub 1988/09/01.
160. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(8):2969-72. Epub 2000/08/24.
161. Berman JJ, Albores-Saavedra J, Bostwick D, Delellis R, Eble J, Hamilton SR, et al. Precancer: a conceptual working definition -- results of a Consensus Conference. *Cancer detection and prevention*. 2006;30(5):387-94. Epub 2006/11/03.
162. Matthaei H, Hong SM, Mayo SC, dal Molin M, Olino K, Venkat R, et al. Presence of pancreatic intraepithelial neoplasia in the pancreatic transection margin does not influence outcome in patients with R0 resected pancreatic cancer. *Annals of surgical oncology*. 2011;18(12):3493-9. Epub 2011/05/04.
163. Castellano-Megias VM, Andres CI, Lopez-Alonso G, Colina-Ruizdelgado F. Pathological features and diagnosis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2014;6(9):311-24. Epub 2014/09/19.
164. Fritz S, Warshaw AL, Thayer SP. Management of mucin-producing cystic neoplasms of the pancreas. *The oncologist*. 2009;14(2):125-36. Epub 2009/02/13.
165. Volkan Adsay N. Cystic lesions of the pancreas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2007;20 Suppl 1:S71-93. Epub 2007/05/09.
166. Basturk O, Hong SM, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, et al. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *The American journal of surgical pathology*. 2015;39(12):1730-41. Epub 2015/11/13.
167. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American journal of surgical pathology*. 2001;25(5):579-86. Epub 2001/05/09.

168. Hruban RH, Maitra A, Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2008;1(4):306-16. Epub 2008/09/13.

169. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(12):897-909. Epub 2002/12/03.

170. Polireddy K, Chen Q. Cancer of the Pancreas: Molecular Pathways and Current Advancement in Treatment. *Journal of Cancer*. 2016;7(11):1497-514. Epub 2016/07/30.

171. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2003;16(9):902-12. Epub 2003/09/19.

172. Matthaei H, Hong SM, Mayo SC, Dal Molin M, Olino K, Venkat R, et al. Presence of pancreatic intraepithelial neoplasia in the pancreatic transection margin does not influence outcome in patients with R0 resected pancreatic cancer. *Indian journal of surgical oncology*. 2011;2(1):9-15. Epub 2011/03/01.

173. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, et al. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(8):977-87. Epub 2004/07/15.

174. Levy P, Jouannaud V, O'Toole D, Couvelard A, Vullierme MP, Palazzo L, et al. Natural history of intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas: actuarial risk of malignancy. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2006;4(4):460-8. Epub 2006/04/18.

175. Eskander MF, Bliss LA, Tseng JF. Pancreatic adenocarcinoma. *Current problems in surgery*. 2016;53(3):107-54. Epub 2016/03/01.

176. 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;518(7540):495-501. Epub 2015/02/27.

177. de Wilde RF, Hruban RH, Maitra A, Offerhaus GJA. Reporting precursors to invasive pancreatic cancer: pancreatic intraepithelial neoplasia, intraductal neoplasms and mucinous cystic neoplasm. *Diagnostic Histopathology*. 2012;18(1):17-30.

178. Samuel N, Hudson TJ. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011;9(2):77-87. Epub 2011/12/21.

179. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*. 2006;20(10):1218-49. Epub 2006/05/17.
180. Scarlett CJ, Salisbury EL, Biankin AV, Kench J. Precursor lesions in pancreatic cancer: morphological and molecular pathology. *Pathology*. 2011;43(3):183-200. Epub 2011/03/26.
181. Gnoni A, Licchetta A, Scarpa A, Azzariti A, Brunetti AE, Simone G, et al. Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(10):19731-62. Epub 2013/10/03.
182. Yoshizawa K, Nagai H, Sakurai S, Hironaka M, Morinaga S, Saitoh K, et al. Clonality and K-ras mutation analyses of epithelia in intraductal papillary mucinous tumor and mucinous cystic tumor of the pancreas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2002;441(5):437-43. Epub 2002/11/26.
183. Lohr M, Kloppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Luttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 2005;7(1):17-23. Epub 2005/02/22.
184. Wu J, Matthaei H, Maitra A, Dal Molin M, Wood LD, Eshleman JR, et al. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Science translational medicine*. 2011;3(92):92ra66. Epub 2011/07/22.
185. Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grutzmann R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed research international*. 2014;2014:474905. Epub 2014/05/02.
186. Jimenez RE, Warshaw AL, Z'Graggen K, Hartwig W, Taylor DZ, Compton CC, et al. Sequential accumulation of K-ras mutations and p53 overexpression in the progression of pancreatic mucinous cystic neoplasms to malignancy. *Annals of surgery*. 1999;230(4):501-9; discussion 9-11. Epub 1999/10/16.
187. Schonleben F, Qiu W, Ciau NT, Ho DJ, Li X, Allendorf JD, et al. PIK3CA mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma of the pancreas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(12):3851-5. Epub 2006/06/17.
188. Schonleben F, Qiu W, Remotti HE, Hohenberger W, Su GH. PIK3CA, KRAS, and BRAF mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/C) of the pancreas. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*. 2008;393(3):289-96. Epub 2008/03/18.
189. Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004;145(12):5459-64. Epub 2004/08/28.

190. Wu J, Jiao Y, Dal Molin M, Maitra A, de Wilde RF, Wood LD, et al. Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(52):21188-93. Epub 2011/12/14.

191. Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, et al. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Current genomics*. 2011;12(1):15-24. Epub 2011/09/03.

192. Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Goto M. Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut and liver*. 2008;2(3):137-54. Epub 2008/12/01.

193. Cooper CL, O'Toole SA, Kench JG. Classification, morphology and molecular pathology of premalignant lesions of the pancreas. *Pathology*. 2013;45(3):286-304. Epub 2013/02/28.

194. Biankin AV, Biankin SA, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Head DR, et al. Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut*. 2002;50(6):861-8. Epub 2002/05/16.

195. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, et al. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*. 2012;142(4):730-3 e9. Epub 2012/01/10.

196. Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2009;133(3):413-22. Epub 2009/03/06.

197. DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC, et al. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *American journal of clinical pathology*. 1994;101(6):684-8. Epub 1994/06/01.

198. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, et al. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer research*. 2000;60(7):2002-6. Epub 2000/04/15.

199. Iacobuzio-Donahue CA, Klimstra DS, Adsay NV, Wilentz RE, Argani P, Sohn TA, et al. Dpc-4 protein is expressed in virtually all human intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: comparison with conventional ductal adenocarcinomas. *The American journal of pathology*. 2000;157(3):755-61. Epub 2000/09/12.

200. Iacobuzio-Donahue CA, Wilentz RE, Argani P, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, et al. Dpc4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas: frequent loss of

expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression. *The American journal of surgical pathology*. 2000;24(11):1544-8. Epub 2000/11/15.

201. Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, et al. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(12):4115-21. Epub 2001/12/26.

202. Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, Luo M, Abe H, Henderson CM, et al. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(11):1806-13. Epub 2009/03/11.

203. Jansen M, Ten Klooster JP, Offerhaus GJ, Clevers H. LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiological reviews*. 2009;89(3):777-98. Epub 2009/07/09.

204. Sahin F, Maitra A, Argani P, Sato N, Maehara N, Montgomery E, et al. Loss of Stk11/Lkb1 expression in pancreatic and biliary neoplasms. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2003;16(7):686-91. Epub 2003/07/16.

205. Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer research*. 2002;62(13):3789-93. Epub 2002/07/05.

206. Goggins M, Hruban RH, Kern SE. BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *The American journal of pathology*. 2000;156(5):1767-71. Epub 2000/05/04.

207. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. 2016;531(7592):47-52. Epub 2016/02/26.

208. van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American journal of pathology*. 2002;161(5):1541-7. Epub 2002/11/05.

209. Hashimoto Y, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Ohge H, et al. Telomere shortening and telomerase expression during multistage carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2008;12(1):17-28; discussion -9. Epub 2007/10/26.

210. Fukushima N, Sato N, Prasad N, Leach SD, Hruban RH, Goggins M. Characterization of gene expression in mucinous cystic neoplasms of the pancreas using oligonucleotide microarrays. *Oncogene*. 2004;23(56):9042-51. Epub 2004/10/19.

211. Ozaki N, Ohmuraya M, Hirota M, Ida S, Wang J, Takamori H, et al. Serine protease inhibitor Kazal type 1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor. *Molecular cancer research : MCR*. 2009;7(9):1572-81. Epub 2009/09/10.

212. Day JD, Digiuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, et al. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Human pathology*. 1996;27(2):119-24. Epub 1996/02/01.

213. Moriya T, Kimura W, Semba S, Sakurai F, Hirai I, Ma J, et al. Biological similarities and differences between pancreatic intraepithelial neoplasias and intraductal papillary mucinous neoplasms. *International journal of gastrointestinal cancer*. 2005;35(2):111-9. Epub 2005/05/10.

214. Yeh TS, Jan YY, Chiu CT, Ho YB, Chen TC, Lee KF, et al. Characterisation of oestrogen receptor, progesterone receptor, trefoil factor 1, and epidermal growth factor and its receptor in pancreatic cystic neoplasms and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*. 2002;51(5):712-6. Epub 2002/10/16.

215. Sessa F, Solcia E, Capella C, Bonato M, Scarpa A, Zamboni G, et al. Intraductal papillary-mucinous tumours represent a distinct group of pancreatic neoplasms: an investigation of tumour cell differentiation and K-ras, p53 and c-erbB-2 abnormalities in 26 patients. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 1994;425(4):357-67. Epub 1994/01/01.

216. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*. 1997;91(4):439-42. Epub 1997/12/09.

217. Crawford HC, Scoggins CR, Washington MK, Matrisian LM, Leach SD. Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(11):1437-44. Epub 2002/06/05.

218. Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Ryu B, Rosty C, Goggins M, Wilentz RE, et al. Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(12):3862-8. Epub 2001/12/26.

219. Kench JG, Eckstein RP, Smith RC. Intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a report of five cases with immunohistochemical findings. *Pathology*. 1997;29(1):7-11. Epub 1997/02/01.
220. Tanaka M, Shibahara J, Fukushima N, Shinozaki A, Umeda M, Ishikawa S, et al. Claudin-18 is an early-stage marker of pancreatic carcinogenesis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2011;59(10):942-52. Epub 2011/08/13.
221. Lee JH, Kim KS, Kim TJ, Hong SP, Song SY, Chung JB, et al. Immunohistochemical analysis of claudin expression in pancreatic cystic tumors. *Oncology reports*. 2011;25(4):971-8. Epub 2011/01/06.
222. Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(4):611-33. Epub 2009/10/14.
223. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51. Epub 2001/02/22.
224. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921. Epub 2001/03/10.
225. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature genetics*. 1996;14(4):457-60. Epub 1996/12/01.
226. Grant GM, Fortney A, Gorreta F, Estep M, Del Giacco L, Van Meter A, et al. Microarrays in cancer research. *Anticancer research*. 2004;24(2A):441-8. Epub 2004/05/22.
227. Chen X, Jorgenson E, Cheung ST. New tools for functional genomic analysis. *Drug discovery today*. 2009;14(15-16):754-60. Epub 2009/05/30.
228. Gruvberger-Saal SK, Cunliffe HE, Carr KM, Hedenfalk IA. Microarrays in breast cancer research and clinical practice--the future lies ahead. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(4):1017-31. Epub 2006/12/13.
229. Tarca AL, Romero R, Draghici S. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2006;195(2):373-88. Epub 2006/08/08.
230. Chavan P, Joshi K, Patwardhan B. DNA microarrays in herbal drug research. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2006;3(4):447-57. Epub 2006/12/19.

231. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270(5235):467-70. Epub 1995/10/20.

232. Buchholz M, Boeck W, Fensterer H, Muller F, Wenger C, Michl P, et al. Use of DNA arrays/microarrays in pancreatic research. *Pancreatology*. 2001;1(6):581-6. Epub 2002/07/18.

233. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature genetics*. 1999;21(1 Suppl):33-7. Epub 1999/01/23.

234. Chou CC, Chen CH, Lee TT, Peck K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic acids research*. 2004;32(12):e99. Epub 2004/07/10.

235. Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature biotechnology*. 2001;19(4):342-7. Epub 2001/04/03.

236. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature biotechnology*. 1996;14(13):1675-80. Epub 1996/12/01.

237. Bumgarner R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al]. 2013;Chapter 22:Unit 22 1. Epub 2013/01/05.

238. Jaluria P, Konstantopoulos K, Betenbaugh M, Shiloach J. A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microbial cell factories*. 2007;6:4. Epub 2007/01/27.

239. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological procedures online*. 2006;8:175-93. Epub 2007/01/24.

240. Gunderson KL, Kruglyak S, Graige MS, Garcia F, Kermani BG, Zhao C, et al. Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome research*. 2004;14(5):870-7. Epub 2004/04/14.

241. Brazma A, Kapushesky M, Parkinson H, Sarkans U, Shojatalab M. Data storage and analysis in ArrayExpress. *Methods in enzymology*. 2006;411:370-86. Epub 2006/08/31.

242. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research*. 2002;30(1):207-10. Epub 2001/12/26.

243. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic acids research*. 2013;41(Database issue):D991-5. Epub 2012/11/30.

244. Kolesnikov N, Hastings E, Keays M, Melnichuk O, Tang YA, Williams E, et al. ArrayExpress update--simplifying data submissions. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D1113-6. Epub 2014/11/02.

245. Ikeyo K, Ishii J, Tamura T, Gojobori T, Tateno Y. CIBEX: center for information biology gene expression database. *Comptes rendus biologies*. 2003;326(10-11):1079-82. Epub 2004/01/28.

246. Ball CA, Brazma A, Causton H, Chervitz S, Edgar R, Hingamp P, et al. Submission of microarray data to public repositories. *PLoS biology*. 2004;2(9):E317. Epub 2004/09/02.

247. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2001;3(1):26-31. Epub 2001/02/28.

248. Petricoin EF, 3rd, Hackett JL, Lesko LJ, Puri RK, Gutman SI, Chumakov K, et al. Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. *Nature genetics*. 2002;32 Suppl:474-9. Epub 2002/11/28.

249. Jeanty C, Longrois D, Mertes PM, Wagner DR, Devaux Y. An optimized protocol for microarray validation by quantitative PCR using amplified amino allyl labeled RNA. *BMC genomics*. 2010;11:542. Epub 2010/10/12.

250. Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, et al. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC genomics*. 2006;7:59. Epub 2006/03/23.

251. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*. 2002;30(6):1292-305. Epub 2002/03/09.

252. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2003;4(11):1120-8. Epub 2003/11/13.

253. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 1987;155:335-50. Epub 1987/01/01.

254. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990;262(4):56-61, 4-5. Epub 1990/04/01.

255. Fraga D MT, Fenster S Real-time PCR In: ARO Cavalcanti, N Stover (eds) *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. John Wiley and Sons, New York, pp 10.3.1–10.3.33. 2008.

256. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005;39(1):75-85. Epub 2005/08/03.

257. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993;11(9):1026-30. Epub 1993/09/01.

258. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996;6(10):986-94. Epub 1996/10/01.

259. Lee MA SD, Leslie DL, Brown T Homogenous fluorescent chemistries for real-time PCR. In: *Real-time PCR: An Essential Guide*. Edwards K, Logan J, Saunders N (eds.). Horizon Bioscience, Norfolk, U.K, pp. 85-102.

260. Becker A, Reith A, Napiwotzki J, Kadenbach B. A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Analytical biochemistry*. 1996;237(2):204-7. Epub 1996/06/01.

261. Quellhorst G HY, Blanchard R Validating microarray data using RT2 real-time PCR. *SA Biosciences*. 2005.

262. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications*. 1995;4(6):357-62. Epub 1995/06/01.

263. Cao H, Shockey JM. Comparison of TaqMan and SYBR Green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(50):12296-303. Epub 2012/11/28.

264. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95. Epub 2001/03/10.

265. Duffy MJ. Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2013;22(1):4-11. Epub 2012/05/16.

266. Hocker JR, Postier RG, Li M, Lerner MR, Lightfoot SA, Peyton MD, et al. Discriminating patients with early-stage pancreatic cancer or chronic pancreatitis using serum electrospray mass profiling. *Cancer letters*. 2015;359(2):314-24. Epub 2015/02/01.

267. Herreros-Villanueva M, Bujanda L. Non-invasive biomarkers in pancreatic cancer diagnosis: what we need versus what we have. *Annals of translational medicine*. 2016;4(7):134. Epub 2016/05/11.

268. Jimeno A, Hidalgo M. Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(4):787-96. Epub 2006/05/02.

269. Lennon AM, Wolfgang CL, Canto MI, Klein AP, Herman JM, Goggins M, et al. The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia? *Cancer research*. 2014;74(13):3381-9. Epub 2014/06/14.

270. Hassanein M, Callison JC, Callaway-Lane C, Aldrich MC, Grogan EL, Massion PP. The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(8):992-1006. Epub 2012/06/13.

271. Hofman P, Popper HH. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2016. Epub 2016/08/25.

272. Yin CQ, Yuan CH, Qu Z, Guan Q, Chen H, Wang FB. Liquid Biopsy of Hepatocellular Carcinoma: Circulating Tumor-Derived Biomarkers. *Disease markers*. 2016;2016:1427849. Epub 2016/07/13.

273. Hegemann M, Stenzl A, Bedke J, Chi KN, Black PC, Todenhofer T. Liquid biopsy: ready to guide therapy in advanced prostate cancer? *BJU international*. 2016. Epub 2016/07/20.

274. Mach N, Gao Y, Lemonnier G, Lecardonnell J, Oswald IP, Estelle J, et al. The peripheral blood transcriptome reflects variations in immunity traits in swine: towards the identification of biomarkers. *BMC genomics*. 2013;14:894. Epub 2013/12/18.

275. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(2):606-12. Epub 2003/02/11.

276. Kaur S, Baine MJ, Jain M, Sasson AR, Batra SK. Early diagnosis of pancreatic cancer: challenges and new developments. *Biomarkers in medicine*. 2012;6(5):597-612. Epub 2012/10/19.

277. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169(5):2756-61. Epub 2002/08/24.

278. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol*. 2002;168(9):4272-6. Epub 2002/04/24.

279. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer research*. 2005;65(6):2457-64. Epub 2005/03/23.

280. Karanjawala ZE, Illei PB, Ashfaq R, Infante JR, Murphy K, Pandey A, et al. New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8. *The American journal of surgical pathology*. 2008;32(2):188-96. Epub 2008/01/29.

281. Ishizone S, Yamauchi K, Kawa S, Suzuki T, Shimizu F, Harada O, et al. Clinical utility of quantitative RT-PCR targeted to alpha1,4-N-acetylglucosaminyltransferase mRNA for detection of pancreatic cancer. *Cancer science*. 2006;97(2):119-26. Epub 2006/01/31.

282. Huang H, Dong X, Kang MX, Xu B, Chen Y, Zhang B, et al. Novel blood biomarkers of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus identified by peripheral blood-based gene expression profiles. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(7):1661-9. Epub 2010/06/24.

283. Baine MJ, Chakraborty S, Smith LM, Mallya K, Sasson AR, Brand RE, et al. Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. *PloS one*. 2011;6(2):e17014. Epub 2011/02/25.

284. Baine MJ, Menning M, Smith LM, Mallya K, Kaur S, Rachagani S, et al. Differential gene expression analysis of peripheral blood mononuclear cells reveals novel test for early detection of pancreatic cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2011;11(1):1-14. Epub 2011/01/01.

285. Hariharan D, Saied A, Kocher HM. Analysis of mortality rates for pancreatic cancer across the world. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2008;10(1):58-62. Epub 2008/08/13.

286. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(4):1896-901. Epub 2003/02/13.

287. Twine NC, Stover JA, Marshall B, Dukart G, Hidalgo M, Stadler W, et al. Disease-associated expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer research*. 2003;63(18):6069-75. Epub 2003/10/03.

288. Liu W, Lee HW, Liu Y, Wang R, Rodgers GP. Olfactomedin 4 is a novel target gene of retinoic acids and 5-aza-2'-deoxycytidine involved in human myeloid

leukemia cell growth, differentiation, and apoptosis. *Blood*. 2010;116(23):4938-47. Epub 2010/08/21.

289. Yan H, Lu D, Xu L, Xie Q, Dong X, Wu Y. Increased expression level of Olfactomedin4 in peripheral blood mononuclear cells of pancreatic adenocarcinoma patients. *Hepato-gastroenterology*. 2011;58(109):1354-9. Epub 2011/09/23.

290. Rosenthal A, Hinzmann B, Mayr T, Adams HP. Methods and kits for diagnosing colorectal cancer. Google Patents; 2013.

291. Brichard V, Clark JS, Coche T, Gaulis SRJT, Gruselle O, Lehmann F, et al. Method for identifying whether a patient will be responder or not to immunotherapy. Google Patents; 2007.

292. Chakraborty S, Baine MJ, Sasson AR, Batra SK. Current status of molecular markers for early detection of sporadic pancreatic cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1815(1):44-64. Epub 2010/10/05.

293. Graham LM, Gupta V, Schafer G, Reid DM, Kimberg M, Dennehy KM, et al. The C-type lectin receptor CLECSF8 (CLEC4D) is expressed by myeloid cells and triggers cellular activation through Syk kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(31):25964-74. Epub 2012/06/13.

294. Arce I, Martinez-Munoz L, Roda-Navarro P, Fernandez-Ruiz E. The human C-type lectin CLECSF8 is a novel monocyte/macrophage endocytic receptor. *European journal of immunology*. 2004;34(1):210-20. Epub 2004/02/19.

295. Wormann SM, Diakopoulos KN, Lesina M, Algul H. The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene*. 2014;33(23):2956-67. Epub 2013/07/16.

296. Roshani R, McCarthy F, Hagemann T. Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. *Cancer letters*. 2014;345(2):157-63. Epub 2013/07/25.

297. Boersma YL, Newman J, Adams TE, Cowieson N, Krippner G, Bozaoglu K, et al. The structure of vanin 1: a key enzyme linking metabolic disease and inflammation. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2014;70(Pt 12):3320-9. Epub 2014/12/06.

298. Granjeaud S, Naquet P, Galland F. An ESTs description of the new Vanin gene family conserved from fly to human. *Immunogenetics*. 1999;49(11-12):964-72. Epub 1999/09/29.

299. Aurrand-Lions M, Galland F, Bazin H, Zakharyev VM, Imhof BA, Naquet P. Vanin-1, a novel GPI-linked perivascular molecule involved in thymus homing. *Immunity*. 1996;5(5):391-405. Epub 1996/11/01.

300. Hu YW, Wu SG, Zhao JJ, Ma X, Lu JB, Xiu JC, et al. VNN1 promotes atherosclerosis progression in apoE^{-/-} mice fed a high-fat/high-cholesterol diet. *Journal of lipid research*. 2016;57(8):1398-411. Epub 2016/06/10.

301. Chen S, Zhang W, Tang C, Tang X, Liu L, Liu C. Vanin-1 is a key activator for hepatic gluconeogenesis. *Diabetes*. 2014;63(6):2073-85. Epub 2014/02/20.

302. Zhang B, Lo C, Shen L, Sood R, Jones C, Cusmano-Ozog K, et al. The role of vanin-1 and oxidative stress-related pathways in distinguishing acute and chronic pediatric ITP. *Blood*. 2011;117(17):4569-79. Epub 2011/02/18.

303. Pouyet L, Roisin-Bouffay C, Clement A, Millet V, Garcia S, Chasson L, et al. Epithelial vanin-1 controls inflammation-driven carcinogenesis in the colitis-associated colon cancer model. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(1):96-104. Epub 2009/07/03.

304. Jansen PA, Kamsteeg M, Rodijk-Olthuis D, van Vlijmen-Willems IM, de Jongh GJ, Bergers M, et al. Expression of the vanin gene family in normal and inflamed human skin: induction by proinflammatory cytokines. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(9):2167-74. Epub 2009/03/27.

305. Holmer R, Goumas FA, Waetzig GH, Rose-John S, Kalthoff H. Interleukin-6: a villain in the drama of pancreatic cancer development and progression. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2014;13(4):371-80. Epub 2014/08/08.

306. Apte MV, Xu Z, Pothula S, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too! *Pancreatology*. 2015;15(4 Suppl):S32-8. Epub 2015/04/08.

307. Cohen R, Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Faivre S, de Gramont A, Raymond E. Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(19):16832-47. Epub 2015/07/15.

308. Ying H, Dey P, Yao W, Kimmelman AC, Draetta GF, Maitra A, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development*. 2016;30(4):355-85. Epub 2016/02/18.

309. Marshall KW, Mohr S, Khettabi FE, Nossova N, Chao S, Bao W, et al. A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2010;126(5):1177-86. Epub 2009/10/02.

310. Yip KT, Das PK, Suria D, Lim CR, Ng GH, Liew CC. A case-controlled validation study of a blood-based seven-gene biomarker panel for colorectal cancer in Malaysia. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2010;29:128. Epub 2010/09/18.

311. Chao S, Ying J, Liew G, Marshall W, Liew CC, Burakoff R. Blood RNA biomarker panel detects both left- and right-sided colorectal neoplasms: a case-control

study. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR. 2013;32:44. Epub 2013/07/24.

312. Rhyasen GW, Starczynowski DT. IRAK signalling in cancer. *British journal of cancer*. 2015;112(2):232-7. Epub 2014/10/08.

313. Hubbard LL, Ballinger MN, Thomas PE, Wilke CA, Standiford TJ, Kobayashi KS, et al. A role for IL-1 receptor-associated kinase-M in prostaglandin E2-induced immunosuppression post-bone marrow transplantation. *J Immunol*. 2010;184(11):6299-308. Epub 2010/05/05.

314. Xie Q, Gan L, Wang J, Wilson I, Li L. Loss of the innate immunity negative regulator IRAK-M leads to enhanced host immune defense against tumor growth. *Molecular immunology*. 2007;44(14):3453-61. Epub 2007/05/05.

315. Klimesova K, Kverka M, Zakostelska Z, Hudcovic T, Hrnčir T, Stepankova R, et al. Altered gut microbiota promotes colitis-associated cancer in IL-1 receptor-associated kinase M-deficient mice. *Inflammatory bowel diseases*. 2013;19(6):1266-77. Epub 2013/04/10.

316. Jenkins BJ. Multifaceted Role of IRAK-M in the Promotion of Colon Carcinogenesis via Barrier Dysfunction and STAT3 Oncoprotein Stabilization in Tumors. *Cancer cell*. 2016;29(5):615-7. Epub 2016/05/12.

317. Tan Q, Majewska-Szczepanik M, Zhang X, Szczepanik M, Zhou Z, Wong FS, et al. IRAK-M deficiency promotes the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2014;63(8):2761-75. Epub 2014/04/04.

318. Standiford TJ, Kuick R, Bhan U, Chen J, Newstead M, Keshamouni VG. TGF-beta-induced IRAK-M expression in tumor-associated macrophages regulates lung tumor growth. *Oncogene*. 2011;30(21):2475-84. Epub 2011/02/01.

319. del Fresno C, Gomez-Garcia L, Caveda L, Escoll P, Arnalich F, Zamora R, et al. Nitric oxide activates the expression of IRAK-M via the release of TNF-alpha in human monocytes. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2004;10(4):213-20. Epub 2004/07/28.

320. del Fresno C, Otero K, Gomez-Garcia L, Gonzalez-Leon MC, Soler-Ranger L, Fuentes-Prior P, et al. Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *J Immunol*. 2005;174(5):3032-40. Epub 2005/02/25.

321. Sotiriou C, Piccart MJ. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nature reviews Cancer*. 2007;7(7):545-53.

322. Bammler T, Beyer RP, Bhattacharya S, Boorman GA, Boyles A, Bradford BU, et al. Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nature methods*. 2005;2(5):351-6. Epub 2005/04/23.

323. Barnes M, Freudenberg J, Thompson S, Aronow B, Pavlidis P. Experimental comparison and cross-validation of the Affymetrix and Illumina gene expression analysis platforms. *Nucleic acids research*. 2005;33(18):5914-23. Epub 2005/10/21.

324. Grutzmann R, Boriss H, Ammerpohl O, Luttges J, Kalthoff H, Schackert HK, et al. Meta-analysis of microarray data on pancreatic cancer defines a set of commonly dysregulated genes. *Oncogene*. 2005;24(32):5079-88. Epub 2005/05/18.

325. Turnbull AK, Kitchen RR, Larionov AA, Renshaw L, Dixon JM, Sims AH. Direct integration of intensity-level data from Affymetrix and Illumina microarrays improves statistical power for robust reanalysis. *BMC medical genomics*. 2012;5:35. Epub 2012/08/23.

326. Wilder SP, Kaisaki PJ, Argoud K, Salhan A, Ragoussis J, Bihoreau MT, et al. Comparative analysis of methods for gene transcription profiling data derived from different microarray technologies in rat and mouse models of diabetes. *BMC genomics*. 2009;10:63. Epub 2009/02/07.

327. Wruck W. Chapter XIII Gene Expression profiling with the BeadArray™ Platform. In: Daskalaki A, editor. *Handbook of research on systems biology applications in medicine*. Hershey, PA ; London: Medical Information Science Reference; 2009. p. 239-50.

328. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*. 2007;8(1):118-27. Epub 2006/04/25.

329. Lazar C, Meganck S, Taminau J, Steenhoff D, Coletta A, Molter C, et al. Batch effect removal methods for microarray gene expression data integration: a survey. *Briefings in bioinformatics*. 2013;14(4):469-90. Epub 2012/08/02.

330. Pavlou MP, Dimitromanolakis A, Martinez-Morillo E, Smid M, Foekens JA, Diamandis EP. Integrating meta-analysis of microarray data and targeted proteomics for biomarker identification: application in breast cancer. *Journal of proteome research*. 2014;13(6):2897-909. Epub 2014/05/07.

331. Yasrebi H. Comparative study of joint analysis of microarray gene expression data in survival prediction and risk assessment of breast cancer patients. *Briefings in bioinformatics*. 2016;17(5):771-85. Epub 2015/10/28.

332. Waldron L, Haibe-Kains B, Culhane AC, Riestler M, Ding J, Wang XV, et al. Comparative meta-analysis of prognostic gene signatures for late-stage ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(5). Epub 2014/04/05.

333. Goonesekere NC, Wang X, Ludwig L, Guda C. A meta analysis of pancreatic microarray datasets yields new targets as cancer genes and biomarkers. *PloS one*. 2014;9(4):e93046. Epub 2014/04/18.

334. Caba O, Prados J, Ortiz R, Jimenez-Luna C, Melguizo C, Alvarez PJ, et al. Transcriptional profiling of peripheral blood in pancreatic adenocarcinoma patients identifies diagnostic biomarkers. *Digestive diseases and sciences*. 2014;59(11):2714-20. Epub 2014/07/30.

335. Lang KS, Lang PA, Meryk A, Pandyra AA, Boucher LM, Pozdeev VI, et al. Involvement of Toso in activation of monocytes, macrophages, and granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(7):2593-8. Epub 2013/01/30.

336. Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y, Torii I, Takayama E, Kang DW, et al. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(12):2779-93. Epub 2009/10/28.

337. Hancer VS, Diz-Kucukkaya R, Aktan M. Overexpression of Fc mu receptor (FCMR, TOSO) gene in chronic lymphocytic leukemia patients. *Med Oncol*. 2012;29(2):1068-72. Epub 2011/01/26.

338. Vire B, David A, Wiestner A. TOSO, the Fcmicro receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation. *J Immunol*. 2011;187(8):4040-50. Epub 2011/09/13.

339. Shima H, Takatsu H, Fukuda S, Ohmae M, Hase K, Kubagawa H, et al. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *International immunology*. 2010;22(3):149-56. Epub 2010/01/01.

340. Nguyen XH, Lang PA, Lang KS, Adam D, Fattakhova G, Foger N, et al. Toso regulates the balance between apoptotic and nonapoptotic death receptor signaling by facilitating RIP1 ubiquitination. *Blood*. 2011;118(3):598-608. Epub 2011/05/27.

341. Richter GH, Mollweide A, Hanewinkel K, Zobywalski C, Burdach S. CD25 blockade protects T cells from activation-induced cell death (AICD) via maintenance of TOSO expression. *Scandinavian journal of immunology*. 2009;70(3):206-15. Epub 2009/08/26.

342. Lang PA, Meryk A, Pandyra AA, Brenner D, Brustle A, Xu HC, et al. Toso regulates differentiation and activation of inflammatory dendritic cells during persistence-prone virus infection. *Cell death and differentiation*. 2015;22(1):164-73. Epub 2014/09/27.

343. Proto-Siqueira R, Panepucci RA, Careta FP, Lee A, Clear A, Morris K, et al. SAGE analysis demonstrates increased expression of TOSO contributing to Fas-mediated resistance in CLL. *Blood*. 2008;112(2):394-7. Epub 2008/04/25.

344. Li FJ, Kubagawa Y, McCollum MK, Wilson L, Motohashi T, Bertoli LF, et al. Enhanced levels of both the membrane-bound and soluble forms of IgM Fc receptor (FcmuR) in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(18):4902-9. Epub 2011/09/13.

345. Pallasch CP, Schulz A, Kutsch N, Schwamb J, Hagist S, Kashkar H, et al. Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease. *Blood*. 2008;112(10):4213-9. Epub 2008/08/19.

346. Pallasch CP, Wendtner CM. Overexpression of the Fas-inhibitory molecule TOSO: a novel antiapoptotic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2009;50(3):498-501. Epub 2009/04/07.

347. Yi S, Yu Z, Zhou K, Wang Y, An G, Li Z, et al. TOSO is overexpressed and correlated with disease progression in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2011;52(1):72-8. Epub 2010/12/08.

348. Hibino S, Kanda M, Oya H, Takami H, Shimizu D, Nomoto S, et al. Reduced expression of DENND2D through promoter hypermethylation is an adverse prognostic factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology reports*. 2014;31(2):693-700. Epub 2013/12/10.

349. Subramani D, Alahari SK. Integrin-mediated function of Rab GTPases in cancer progression. *Molecular cancer*. 2010;9:312. Epub 2010/12/15.

350. Cheng KW, Lahad JP, Kuo WL, Lapuk A, Yamada K, Auersperg N, et al. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nature medicine*. 2004;10(11):1251-6. Epub 2004/10/27.

351. Marat AL, Dokainish H, McPherson PS. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(16):13791-800. Epub 2011/02/19.

352. Ling B, Zheng H, Fu G, Yuan J, Shi T, Chen S, et al. Suppression of non-small cell lung cancer proliferation and tumorigenicity by DENND2D. *Lung Cancer*. 2013;79(2):104-10. Epub 2012/11/28.

353. Kanda M, Nomoto S, Oya H, Takami H, Hibino S, Hishida M, et al. Downregulation of DENND2D by promoter hypermethylation is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*. 2014;44(1):44-52. Epub 2013/11/06.

354. Kanda M, Shimizu D, Nomoto S, Takami H, Hibino S, Oya H, et al. Prognostic impact of expression and methylation status of DENN/MADD domain-

containing protein 2D in gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2015;18(2):288-96. Epub 2014/04/04.

355. Huang CC, Tu SH, Lien HH, Jeng JY, Huang CS, Huang CJ, et al. Concurrent gene signatures for han chinese breast cancers. *PLoS one*. 2013;8(10):e76421. Epub 2013/10/08.

356. Repo H, Kuokkanen E, Oksanen E, Goldman A, Heikinheimo P. Is the bovine lysosomal phospholipase B-like protein an amidase? *Proteins*. 2014;82(2):300-11. Epub 2013/08/13.

357. Xu S, Zhao L, Larsson A, Venge P. The identification of a phospholipase B precursor in human neutrophils. *The FEBS journal*. 2009;276(1):175-86. Epub 2008/11/21.

358. Adamski MG, Li Y, Wagner E, Yu H, Seales-Bailey C, Soper SA, et al. Expression profile based gene clusters for ischemic stroke detection. *Genomics*. 2014;104(3):163-9. Epub 2014/08/20.

359. Wang Y, Jia H, Lin H, Tan X, Du Z, Chen H, et al. Metastasis-associated gene, mag-1 improves tumour microenvironmental adaptation and potentiates tumour metastasis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012;16(12):3037-51. Epub 2012/09/19.

360. Morita Y, Sakaguchi T, Ikegami K, Goto-Inoue N, Hayasaka T, Hang VT, et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. *Journal of hepatology*. 2013;59(2):292-9. Epub 2013/04/10.

361. Mansilla F, da Costa KA, Wang S, Kruhoffer M, Lewin TM, Orntoft TF, et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) overexpression in human colorectal cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(1):85-97. Epub 2008/11/01.

362. Zhang J, Meng Y, Lin H, Liu G, Wang Y, Chen H, et al. [Promotion of MAG-1 on Metastasis of Lung Cancer Cells in vitro and Its Expression in Lung Cancer Tissue of 24 Cases.]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*. 2009;12(2):93-9. Epub 2009/02/20.

363. Grupp K, Sanader S, Sirma H, Simon R, Koop C, Prien K, et al. High lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 expression independently predicts high risk for biochemical recurrence in prostate cancers. *Molecular oncology*. 2013;7(6):1001-11. Epub 2013/08/15.

364. Zhou X, Lawrence TJ, He Z, Pound CR, Mao J, Bigler SA. The expression level of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) correlates to the

progression of prostate cancer. *Experimental and molecular pathology*. 2012;92(1):105-10. Epub 2011/11/22.

365. Abdelzaher E, Mostafa MF. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) upregulation in breast carcinoma contributes to tumor progression and predicts early tumor recurrence. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015;36(7):5473-83. Epub 2015/02/17.

366. Bayat B, Werth S, Sachs UJ, Newman DK, Newman PJ, Santoso S. Neutrophil transmigration mediated by the neutrophil-specific antigen CD177 is influenced by the endothelial S536N dimorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1. *J Immunol*. 2010;184(7):3889-96. Epub 2010/03/03.

367. Shahabi V, Berman D, Chasalow SD, Wang L, Tsuchihashi Z, Hu B, et al. Gene expression profiling of whole blood in ipilimumab-treated patients for identification of potential biomarkers of immune-related gastrointestinal adverse events. *Journal of translational medicine*. 2013;11:75. Epub 2013/03/26.

368. Tognon R, Gasparotto EP, Neves RP, Nunes NS, Ferreira AF, Palma PV, et al. Deregulation of apoptosis-related genes is associated with PRV1 overexpression and JAK2 V617F allele burden in Essential Thrombocythemia and Myelofibrosis. *Journal of hematology & oncology*. 2012;5:2. Epub 2012/02/04.

369. Melis S, Vellinga S, Zachee P, Sierens AC, De Schouwer PJ. JAK2 V617F mutation and PRV-1 overexpression: relevance in the diagnosis of polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Acta clinica Belgica*. 2009;64(5):429-33. Epub 2009/12/17.

370. Stroncek DF, Caruccio L, Bettinotti M. CD177: A member of the Ly-6 gene superfamily involved with neutrophil proliferation and polycythemia vera. *Journal of translational medicine*. 2004;2(1):8. Epub 2004/03/31.

371. Toyoda T, Tsukamoto T, Yamamoto M, Ban H, Saito N, Takasu S, et al. Gene expression analysis of a Helicobacter pylori-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model: identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. *BMC gastroenterology*. 2013;13:122. Epub 2013/08/01.

372. Pietzsch J, Hoppmann S. Human S100A12: a novel key player in inflammation? *Amino acids*. 2009;36(3):381-9. Epub 2008/04/30.

373. Meijer B, Gearry RB, Day AS. The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. *International journal of inflammation*. 2012;2012:907078. Epub 2012/07/20.

374. Kosaki A, Hasegawa T, Kimura T, Iida K, Hitomi J, Matsubara H, et al. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with type 2 diabetes. *The*

Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2004;89(11):5423-8. Epub 2004/11/09.

375. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Georgoulas P, Tzavara C, Valotassiou V, Kapsoritaki A, et al. Moderate performance of serum S100A12, in distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. BMC gastroenterology. 2010;10:118. Epub 2010/10/16.

376. Zhao B, Chen Y, Sun WW, Chen WW, Ma L, Yang ZT, et al. Effect of S100A12 and soluble receptor for advanced glycation end products on the occurrence of severe acute pancreatitis. Journal of digestive diseases. 2016;17(7):475-82. Epub 2016/06/03.

377. Feng Z, Yinchu Z, Yinsheng S, Fengqing W, Xiaoyang Z, Jin L, et al. Potential effects of calcium binding protein S100A12 on severity evaluation and curative effect of severe acute pancreatitis. Inflammation. 2015;38(1):290-7. Epub 2014/10/01.

378. Karl J, Wild N, Tacke M, Andres H, Garczarek U, Rollinger W, et al. Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. 2008;6(10):1122-8. Epub 2008/10/22.

379. Thierolf M, Hagmann ML, Pfeffer M, Berntenis N, Wild N, Roessler M, et al. Towards a comprehensive proteome of normal and malignant human colon tissue by 2-D-LC-ESI-MS and 2-DE proteomics and identification of S100A12 as potential cancer biomarker. Proteomics Clinical applications. 2008;2(1):11-22. Epub 2008/01/01.

380. Rodvold JJ, Mahadevan NR, Zanetti M. Lipocalin 2 in cancer: when good immunity goes bad. Cancer letters. 2012;316(2):132-8. Epub 2011/11/15.

381. Yang J, Moses MA. Lipocalin 2: a multifaceted modulator of human cancer. Cell Cycle. 2009;8(15):2347-52. Epub 2009/07/03.

382. Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Laiho P, Aaltonen LA, et al. Gene expression in colorectal cancer. Cancer research. 2002;62(15):4352-63. Epub 2002/08/03.

383. Chung IH, Wu TI, Liao CJ, Hu JY, Lin YH, Tai PJ, et al. Overexpression of lipocalin 2 in human cervical cancer enhances tumor invasion. Oncotarget. 2016;7(10):11113-26. Epub 2016/02/04.

384. Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, et al. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. International journal of cancer. 2004;112(1):14-25. Epub 2004/08/12.

385. Ding G, Wang J, Feng C, Jiang H, Xu J, Ding Q. Lipocalin 2 over-expression facilitates progress of castration-resistant prostate cancer via improving androgen receptor transcriptional activity. *Oncotarget*. 2016. Epub 2016/09/08.

386. Han H, Bearss DJ, Browne LW, Calaluce R, Nagle RB, Von Hoff DD. Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer research*. 2002;62(10):2890-6. Epub 2002/05/23.

387. Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, et al. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer research*. 2003;63(24):8614-22. Epub 2003/12/26.

388. Moniaux N, Chakraborty S, Yalniz M, Gonzalez J, Shostrom VK, Standop J, et al. Early diagnosis of pancreatic cancer: neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of pancreatic intraepithelial neoplasia. *British journal of cancer*. 2008;98(9):1540-7. Epub 2008/04/09.

389. Hiemstra PS. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochemical Society transactions*. 2002;30(2):116-20. Epub 2002/05/25.

390. Amiano NO, Costa MJ, Reiteri RM, Payes C, Guerrieri D, Tateosian NL, et al. Anti-tumor effect of SLPI on mammary but not colon tumor growth. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(2):469-75. Epub 2012/07/07.

391. Liu G, Yang J, Zhao Y, Wang Z, Xing B, Wang L, et al. Expression of secretory leukocyte protease inhibitor detected by immunohistochemistry correlating with prognosis and metastasis in colorectal cancer. *World journal of surgical oncology*. 2014;12:369. Epub 2014/12/03.

392. Cheng WL, Wang CS, Huang YH, Liang Y, Lin PY, Hsueh C, et al. Overexpression of a secretory leukocyte protease inhibitor in human gastric cancer. *International journal of cancer*. 2008;123(8):1787-96. Epub 2008/08/09.

393. Guo J, Li G, Zhuang J, Ji C, Liu F, Tao G, et al. [Expression and clinical significance of secretory leukocyte protease inhibitor in colon carcinoma]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2013;33(6):898-901. Epub 2013/06/28.

394. Liu F, Guo JB, Shen ZY, Mu TY, Zhi PK, Li GX. [Application of genome-wide microarray for screening genes related to peritoneal metastasis of colorectal cancer]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2012;32(3):400-3. Epub 2012/03/27.

395. Oh MK, Park HJ, Lee JH, Bae HM, Kim IS. Single chain precursor prohepoglobulin promotes angiogenesis by upregulating expression of vascular

endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor2. *FEBS letters*. 2015;589(9):1009-17. Epub 2015/03/18.

396. Zhang S, Shang S, Li W, Qin X, Liu Y. Insights on N-glycosylation of human haptoglobin and its association with cancers. *Glycobiology*. 2016;26(7):684-92. Epub 2016/02/14.

397. Villegas-Pineda JC, Garibay-Cerdenares OL, Hernandez-Ramirez VI, Gallardo-Rincon D, Cantu de Leon D, Perez-Montiel-Gomez MD, et al. Integrins and haptoglobin: Molecules overexpressed in ovarian cancer. *Pathology, research and practice*. 2015;211(12):973-81. Epub 2015/11/10.

398. Lu J, Wang Y, Yan M, Feng P, Yuan L, Cai Y, et al. High serum haptoglobin level is associated with tumor progression and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016. Epub 2016/06/02.

399. Chang YK, Lai YH, Chu Y, Lee MC, Huang CY, Wu S. Haptoglobin is a serological biomarker for adenocarcinoma lung cancer by using the ProteomeLab PF2D combined with mass spectrometry. *American journal of cancer research*. 2016;6(8):1828-36. Epub 2016/09/21.

400. Shang S, Qin X, Li W, Zhang S, Liu Y. ELISA index of serum fucosylated haptoglobin for diagnosis of HCC using the normal and reverse AAL ELISA. *Discovery medicine*. 2016;21(113):15-23. Epub 2016/02/21.

401. Miyoshi E, Nakano M. Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: detailed analyses of oligosaccharide structures. *Proteomics*. 2008;8(16):3257-62. Epub 2008/07/23.

402. Miyoshi E, Kamada Y. Application of glycoscience to the early detection of pancreatic cancer. *Cancer science*. 2016. Epub 2016/07/16.

403. Sharma N, Jha S. NLR-regulated pathways in cancer: opportunities and obstacles for therapeutic interventions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(9):1741-64. Epub 2015/12/29.

404. Zhiyu W, Wang N, Wang Q, Peng C, Zhang J, Liu P, et al. The inflammasome: an emerging therapeutic oncotarget for cancer prevention. *Oncotarget*. 2016. Epub 2016/05/22.

405. Kingeter LM, Lin X. C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses. *Cellular & molecular immunology*. 2012;9(2):105-12. Epub 2012/01/17.

406. Seifert L, Werba G, Tiwari S, Gao Ly NN, Alothman S, Alqunaibit D, et al. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature*. 2016;532(7598):245-9. Epub 2016/04/07.

407. Holweg A, Schnare M, Gessner A. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the innate defence of the lower airways. *Biochemical Society transactions*. 2011;39(4):1045-50. Epub 2011/07/27.

408. Can G, Akin H, Ozdemir FT, Can H, Yilmaz B, Eren F, et al. Bactericidal permeability increasing protein gene polymorphism is associated with inflammatory bowel diseases in the Turkish population. *Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2015;21(4):239-44. Epub 2015/08/01.

409. Kuo YB, Chan CC, Chang CA, Fan CW, Hung RP, Hung YS, et al. Identification of phospholipid scramblase 1 as a biomarker and determination of its prognostic value for colorectal cancer. *Mol Med*. 2011;17(1-2):41-7. Epub 2010/10/12.

410. Chen CY, Chen JS, Chou YP, Kuo YB, Fan CW, Chan EC. Antibody against N-terminal domain of phospholipid scramblase 1 induces apoptosis in colorectal cancer cells through the intrinsic apoptotic pathway. *Chemical biology & drug design*. 2014;84(1):36-43. Epub 2014/04/29.

411. Cui W, Li SY, Du JF, Zhu ZM, An P. Silencing phospholipid scramblase 1 expression by RNA interference in colorectal cancer and metastatic liver cancer. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2012;11(4):393-400. Epub 2012/08/16.

412. Thalappilly S, Suliman M, Gayet O, Soubeyran P, Hermant A, Lecine P, et al. Identification of multi-SH3 domain-containing protein interactome in pancreatic cancer: a yeast two-hybrid approach. *Proteomics*. 2008;8(15):3071-81. Epub 2008/07/26.

413. Fan CW, Chen CY, Chen KT, Shen CR, Kuo YB, Chen YS, et al. Blockade of phospholipid scramblase 1 with its N-terminal domain antibody reduces tumorigenesis of colorectal carcinomas in vitro and in vivo. *Journal of translational medicine*. 2012;10:254. Epub 2012/12/25.

414. Bohanes P, Yang D, Loupakis F, LaBonte MJ, Gerger A, Ning Y, et al. Integrin genetic variants and stage-specific tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer. *The pharmacogenomics journal*. 2015;15(3):226-34. Epub 2014/12/10.

415. Switala-Jelen K, Dabrowska K, Opolski A, Lipinska L, Nowaczyk M, Gorski A. The biological functions of beta3 integrins. *Folia biologica*. 2004;50(5):143-52. Epub 2004/12/08.

416. Varner JA, Cheresh DA. Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin alphavbeta3. *Important advances in oncology*. 1996:69-87. Epub 1996/01/01.

417. Gerger A, Hofmann G, Langsenlehner U, Renner W, Weitzer W, Wehrschutz M, et al. Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and colorectal cancer risk. *International journal of colorectal disease*. 2009;24(2):159-63. Epub 2008/10/07.

418. Lei Y, Huang K, Gao C, Lau QC, Pan H, Xie K, et al. Proteomics identification of ITGB3 as a key regulator in reactive oxygen species-induced migration and invasion of colorectal cancer cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10(10):M110 005397. Epub 2011/05/31.

419. Zhou T, Wang T, Garcia JG. Genes influenced by the non-muscle isoform of Myosin light chain kinase impact human cancer prognosis. *PloS one*. 2014;9(4):e94325. Epub 2014/04/10.

420. Huang YQ, Han ZD, Liang YX, Lin ZY, Ling XH, Fu X, et al. Decreased expression of myosin light chain MYL9 in stroma predicts malignant progression and poor biochemical recurrence-free survival in prostate cancer. *Med Oncol*. 2014;31(1):820. Epub 2013/12/18.

421. Tan X, Chen M. MYLK and MYL9 expression in non-small cell lung cancer identified by bioinformatics analysis of public expression data. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(12):12189-200. Epub 2014/09/03.

422. Jin GH, Xu W, Shi Y, Wang LB. Celecoxib exhibits an anti-gastric cancer effect by targeting focal adhesion and leukocyte transendothelial migration-associated genes. *Oncology letters*. 2016;12(4):2345-50. Epub 2016/10/05.

423. Davidson B. The diagnostic and molecular characteristics of malignant mesothelioma and ovarian/peritoneal serous carcinoma. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*. 2011;22(1):5-21. Epub 2010/12/01.

424. Yuan Y, Nymoen DA, Dong HP, Bjorang O, Shih le M, Low PS, et al. Expression of the folate receptor genes FOLR1 and FOLR3 differentiates ovarian carcinoma from breast carcinoma and malignant mesothelioma in serous effusions. *Human pathology*. 2009;40(10):1453-60. Epub 2009/05/21.

425. Zee RY, Rose L, Chasman DI, Ridker PM. Genetic variation of fifteen folate metabolic pathway associated gene loci and the risk of incident head and neck carcinoma: the Women's Genome Health Study. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;418:33-6. Epub 2013/01/02.

426. Li J, Matye DJ, Li T. Insulin resistance induces posttranslational hepatic sortilin 1 degradation in mice. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(18):11526-36. Epub 2015/03/26.

427. Shi J, Kandror KV. Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Developmental cell*. 2005;9(1):99-108. Epub 2005/07/05.

428. Smirnov DA, Foulk BW, Doyle GV, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM. Global gene expression profiling of circulating endothelial cells in patients with metastatic carcinomas. *Cancer research*. 2006;66(6):2918-22. Epub 2006/03/17.

429. Hemmati S, Zarnani AH, Mahmoudi AR, Sadeghi MR, Soltangharaee H, Akhondi MM, et al. Ectopic Expression of Sortilin 1 (NTR-3) in Patients with Ovarian Carcinoma. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2009;1(2):125-31. Epub 2009/07/01.

430. Ghaemimanesh F, Ahmadian G, Talebi S, Zarnani AH, Behmanesh M, Hemmati S, et al. The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 2014;6(3):169-77. Epub 2014/09/13.

431. Hochmeister S, Grundtner R, Bauer J, Engelhardt B, Lyck R, Gordon G, et al. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2006;65(9):855-65. Epub 2006/09/08.

432. Wu N, Liu S, Guo C, Hou Z, Sun MZ. The role of annexin A3 playing in cancers. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2013;15(2):106-10. Epub 2012/09/27.

433. Pan QZ, Pan K, Weng DS, Zhao JJ, Zhang XF, Wang DD, et al. Annexin A3 promotes tumorigenesis and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Molecular carcinogenesis*. 2015;54(8):598-607. Epub 2014/01/01.

434. Tong M, Fung TM, Luk ST, Ng KY, Lee TK, Lin CH, et al. ANXA3/JNK Signaling Promotes Self-Renewal and Tumor Growth, and Its Blockade Provides a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Stem cell reports*. 2015;5(1):45-59. Epub 2015/06/23.

435. Yan X, Yin J, Yao H, Mao N, Yang Y, Pan L. Increased expression of annexin A3 is a mechanism of platinum resistance in ovarian cancer. *Cancer research*. 2010;70(4):1616-24. Epub 2010/01/28.

436. Chang YT, Yao CT, Su SL, Chou YC, Chu CM, Huang CS, et al. Verification of gene expression profiles for colorectal cancer using 12 internet public microarray datasets. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(46):17476-82. Epub 2014/12/18.

437. Pan QZ, Pan K, Wang QJ, Weng DS, Zhao JJ, Zheng HX, et al. Annexin A3 as a potential target for immunotherapy of liver cancer stem-like cells. *Stem Cells*. 2015;33(2):354-66. Epub 2014/10/01.

438. Takahashi H, Kaniwa N, Saito Y, Sai K, Hamaguchi T, Shirao K, et al. Construction of possible integrated predictive index based on EGFR and ANXA3 polymorphisms for chemotherapy response in fluoropyrimidine-treated Japanese gastric cancer patients using a bioinformatic method. *BMC cancer*. 2015;15:718. Epub 2015/10/18.
439. Penzvalto Z, Tegze B, Szasz AM, Sztupinszki Z, Liko I, Szendroi A, et al. Identifying resistance mechanisms against five tyrosine kinase inhibitors targeting the ERBB/RAS pathway in 45 cancer cell lines. *PloS one*. 2013;8(3):e59503. Epub 2013/04/05.
440. Eon Kuek L, Leffler M, Mackay GA, Hulett MD. The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunology and cell biology*. 2016;94(1):11-23. Epub 2015/04/04.
441. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *Journal of medical genetics*. 2016;53(9):575-90. Epub 2016/06/03.
442. Ai J, Advani A. Current status of antibody therapy in ALL. *British journal of haematology*. 2015;168(4):471-80. Epub 2014/11/11.
443. Han M, Liew CT, Zhang HW, Chao S, Zheng R, Yip KT, et al. Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(2):455-60. Epub 2008/01/22.
444. Hsiao YW, Lai TC, Lin YH, Su CY, Lee JJ, Liao AT, et al. Granulysin expressed in a humanized mouse model induces apoptotic cell death and suppresses tumorigenicity. *Oncotarget*. 2016. Epub 2016/08/27.
445. Lin J, Huang Y, Zhang L, Tang W, Li X, Wang X, et al. Evaluation of serum granulysin as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;454:72-6. Epub 2016/01/12.
446. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(25):2654-66. Epub 2005/12/24.
447. Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H, Sugasawa H, Majima T, Kawarabayashi N, et al. Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22(8):1322-7. Epub 2007/08/11.
448. Hahtola S, Tuomela S, Elo L, Hakkinen T, Karenko L, Nedoszytko B, et al. Th1 response and cytotoxicity genes are down-regulated in cutaneous T-cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(16):4812-21. Epub 2006/08/18.

449. Medley QG, Kedersha N, O'Brien S, Tian Q, Schlossman SF, Streuli M, et al. Characterization of GMP-17, a granule membrane protein that moves to the plasma membrane of natural killer cells following target cell recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(2):685-9. Epub 1996/01/23.

450. Mori S, Jewett A, Cavalcanti M, Murakami-Mori K, Nakamura S, Bonavida B. Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFN-alpha and PMA/ionomycin. *International journal of oncology*. 1998;12(5):1165-70. Epub 1998/06/06.

451. Krol M, Polanska J, Pawlowski KM, Turowski P, Skierski J, Majewska A, et al. Transcriptomic signature of cell lines isolated from canine mammary adenocarcinoma metastases to lungs. *Journal of applied genetics*. 2010;51(1):37-50. Epub 2010/02/11.

452. Germain C, Meier A, Jensen T, Knapnougel P, Poupon G, Lazzari A, et al. Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon-gamma contributes to modulate immune responses. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(44):37964-75. Epub 2011/09/21.

453. Bamgard ND, Mathew SO, Mathew PA. LLT1-mediated activation of IFN-gamma production in human natural killer cells involves ERK signalling pathway. *Scandinavian journal of immunology*. 2010;71(3):210-9. Epub 2010/04/27.

454. Roth P, Mittelbronn M, Wick W, Meyermann R, Tatagiba M, Weller M. Malignant glioma cells counteract antitumor immune responses through expression of lectin-like transcript-1. *Cancer research*. 2007;67(8):3540-4. Epub 2007/04/19.

455. Mathew SO, Chaudhary P, Powers SB, Vishwanatha JK, Mathew PA. Overexpression of LLT1 (OCIL, CLEC2D) on prostate cancer cells inhibits NK cell-mediated killing through LLT1-NKRP1A (CD161) interaction. *Oncotarget*. 2016. Epub 2016/09/15.

456. Aldemir H, Prod'homme V, Dumaurier MJ, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, et al. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol*. 2005;175(12):7791-5. Epub 2005/12/13.

457. Kashiwakura J, Suzuki N, Nagafuchi H, Takeno M, Takeba Y, Shimoyama Y, et al. Txk, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family, is expressed in T helper type 1 cells and regulates interferon gamma production in human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(8):1147-54. Epub 1999/10/19.

458. Schwartzberg PL, Finkelstein LD, Readinger JA. TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(4):284-95. Epub 2005/04/02.

459. Sahu N, Venegas AM, Jankovic D, Mitzner W, Gomez-Rodriguez J, Cannons JL, et al. Selective expression rather than specific function of Txk and Itk regulate Th1 and Th2 responses. *J Immunol*. 2008;181(9):6125-31. Epub 2008/10/23.

460. Aldhamen YA, Seregin SS, Aylsworth CF, Godbehere S, Amalfitano A. Manipulation of EAT-2 expression promotes induction of multiple beneficial regulatory and effector functions of the human innate immune system as a novel immunomodulatory strategy. *International immunology*. 2014;26(5):291-303. Epub 2014/01/01.

461. Ksionda O, Limnander A, Roose JP. RasGRP Ras guanine nucleotide exchange factors in cancer. *Frontiers in biology*. 2013;8(5):508-32. Epub 2014/04/20.

462. Ksionda O, Melton AA, Bache J, Tenhagen M, Bakker J, Harvey R, et al. RasGRP1 overexpression in T-ALL increases basal nucleotide exchange on Ras rendering the Ras/PI3K/Akt pathway responsive to protumorigenic cytokines. *Oncogene*. 2016;35(28):3658-68. Epub 2015/11/10.

463. Dower NA, Stang SL, Bottorff DA, Ebinu JO, Dickie P, Ostergaard HL, et al. RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nature immunology*. 2000;1(4):317-21. Epub 2001/03/23.

464. Hartzell C, Ksionda O, Lemmens E, Coakley K, Yang M, Dail M, et al. Dysregulated RasGRP1 responds to cytokine receptor input in T cell leukemogenesis. *Science signaling*. 2013;6(268):ra21. Epub 2013/03/28.

465. Sharma A, Fonseca LL, Rajani C, Yanagida JK, Endo Y, Cline JM, et al. Targeted deletion of RasGRP1 impairs skin tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2014;35(5):1084-91. Epub 2014/01/28.

466. Depeille P, Henricks LM, van de Ven RA, Lemmens E, Wang CY, Matli M, et al. RasGRP1 opposes proliferative EGFR-SOS1-Ras signals and restricts intestinal epithelial cell growth. *Nature cell biology*. 2015;17(6):804-15. Epub 2015/05/26.

467. Videira PA, Amado IF, Crespo HJ, Alguero MC, Dall'Olio F, Cabral MG, et al. Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconjugate journal*. 2008;25(3):259-68. Epub 2007/12/15.

468. Lu J, Gu J. Significance of beta-Galactoside alpha2,6 Sialyltransferase 1 in Cancers. *Molecules*. 2015;20(5):7509-27. Epub 2015/04/29.

469. Ma H, Cheng L, Hao K, Li Y, Song X, Zhou H, et al. Reversal effect of ST6GAL 1 on multidrug resistance in human leukemia by regulating the PI3K/Akt pathway and the expression of P-gp and MRP1. *PloS one*. 2014;9(1):e85113. Epub 2014/01/24.

470. Zhu Y, Srivatana U, Ullah A, Gagneja H, Berenson CS, Lance P. Suppression of a sialyltransferase by antisense DNA reduces invasiveness of human colon cancer cells in vitro. *Biochimica et biophysica acta*. 2001;1536(2-3):148-60. Epub 2001/06/19.

471. Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer research*. 2005;65(11):4645-52. Epub 2005/06/03.

472. Swindall AF, Londono-Joshi AI, Schultz MJ, Fineberg N, Buchsbaum DJ, Bellis SL. ST6Gal-I protein expression is upregulated in human epithelial tumors and correlates with stem cell markers in normal tissues and colon cancer cell lines. *Cancer research*. 2013;73(7):2368-78. Epub 2013/01/30.

473. Lin S, Kemmner W, Grigull S, Schlag PM. Cell surface alpha 2,6 sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells. *Experimental cell research*. 2002;276(1):101-10. Epub 2002/04/30.

474. Park JJ, Yi JY, Jin YB, Lee YJ, Lee JS, Lee YS, et al. Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochemical pharmacology*. 2012;83(7):849-57. Epub 2012/01/24.

475. Antony P, Rose M, Heidenreich A, Knuchel R, Gaisa NT, Dahl E. Epigenetic inactivation of ST6GAL1 in human bladder cancer. *BMC cancer*. 2014;14:901. Epub 2014/12/04.

476. Kroes RA, Moskal JR. The role of DNA methylation in ST6Gal1 expression in gliomas. *Glycobiology*. 2016. Epub 2016/08/12.

477. Wild PJ, Herr A, Wissmann C, Stoehr R, Rosenthal A, Zaak D, et al. Gene expression profiling of progressive papillary noninvasive carcinomas of the urinary bladder. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(12):4415-29. Epub 2005/06/17.

478. Yang X, Tao Z, Zhu Z, Liao H, Zhao Y, Fan H. MicroRNA-593-3p regulates insulin-promoted glucose consumption by targeting Slc38a1 and CLIP3. *Journal of molecular endocrinology*. 2016;57(4):211-22. Epub 2016/09/11.

479. Xie J, Chen Z, Liu L, Li P, Zhu X, Gao H, et al. shRNA-mediated Slc38a1 silencing inhibits migration, but not invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*. 2013;25(5):514-9. Epub 2013/11/21.

480. Kondoh N, Imazeki N, Arai M, Hada A, Hatsuse K, Matsuo H, et al. Activation of a system A amino acid transporter, ATA1/SLC38A1, in human

hepatocellular carcinoma and preneoplastic liver tissues. *International journal of oncology*. 2007;31(1):81-7. Epub 2007/06/06.

481. Wang K, Cao F, Fang W, Hu Y, Chen Y, Ding H, et al. Activation of SNAT1/SLC38A1 in human breast cancer: correlation with p-Akt overexpression. *BMC cancer*. 2013;13:343. Epub 2013/07/16.

482. Xie J, Li P, Gao HF, Qian JX, Yuan LY, Wang JJ. Overexpression of SLC38A1 is associated with poorer prognosis in Chinese patients with gastric cancer. *BMC gastroenterology*. 2014;14:70. Epub 2014/04/10.

483. Raposo B, Vaartjes D, Ahlqvist E, Nandakumar KS, Holmdahl R. System A amino acid transporters regulate glutamine uptake and attenuate antibody-mediated arthritis. *Immunology*. 2015;146(4):607-17. Epub 2015/09/09.

484. Chai Y, Huang X, Cong B, Liu S, Chen K, Li G, et al. Involvement of VAMP-2 in exocytosis of IL-1 beta in turbot (*Scophthalmus maximus*) leukocytes after *Vibrio anguillarum* infection. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;342(2):509-13. Epub 2006/02/21.

485. Shukla A, Berglund L, Nielsen LP, Nielsen S, Hoffmann HJ, Dahl R. Regulated exocytosis in immune function: are SNARE-proteins involved? *Respiratory medicine*. 2000;94(1):10-7. Epub 2000/03/14.

486. Mollinedo F, Martin-Martin B, Calafat J, Nabokina SM, Lazo PA. Role of vesicle-associated membrane protein-2, through Q-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor/R-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor interaction, in the exocytosis of specific and tertiary granules of human neutrophils. *J Immunol*. 2003;170(2):1034-42. Epub 2003/01/09.

487. Smolen JE, Hessler RJ, Nauseef WM, Goedken M, Joe Y. Identification and cloning of the SNARE proteins VAMP-2 and syntaxin-4 from HL-60 cells and human neutrophils. *Inflammation*. 2001;25(4):255-65. Epub 2001/10/03.

488. Puri N, Roche PA. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(7):2580-5. Epub 2008/02/06.

489. Logan MR, Lacy P, Bablitz B, Moqbel R. Expression of eosinophil target SNAREs as potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;109(2):299-306. Epub 2002/02/14.

490. Pagan JK, Wylie FG, Joseph S, Widberg C, Bryant NJ, James DE, et al. The t-SNARE syntaxin 4 is regulated during macrophage activation to function in

membrane traffic and cytokine secretion. *Current biology : CB*. 2003;13(2):156-60. Epub 2003/01/28.

491. Murray RZ, Wylie FG, Khromykh T, Hume DA, Stow JL. Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis Factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10478-83. Epub 2005/01/11.

492. Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL. A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science*. 2005;310(5753):1492-5. Epub 2005/11/12.

493. Hong W. Cytotoxic T lymphocyte exocytosis: bring on the SNAREs! *Trends in cell biology*. 2005;15(12):644-50. Epub 2005/11/02.

494. Krus U, King BC, Nagaraj V, Gandasi NR, Sjolander J, Buda P, et al. The complement inhibitor CD59 regulates insulin secretion by modulating exocytotic events. *Cell metabolism*. 2014;19(5):883-90. Epub 2014/04/15.

495. Randhawa VK, Bilan PJ, Khayat ZA, Daneman N, Liu Z, Ramlal T, et al. VAMP2, but not VAMP3/cellubrevin, mediates insulin-dependent incorporation of GLUT4 into the plasma membrane of L6 myoblasts. *Molecular biology of the cell*. 2000;11(7):2403-17. Epub 2000/07/11.

496. Aldhamen YA, Seregin SS, Kousa YA, Rastall DP, Appledorn DM, Godbehere S, et al. Improved cytotoxic T-lymphocyte immune responses to a tumor antigen by vaccines co-expressing the SLAM-associated adaptor EAT-2. *Cancer gene therapy*. 2013;20(10):564-75. Epub 2013/08/21.

497. Schonfeld D, Matschiner G, Chatwell L, Trentmann S, Gille H, Hulsmeier M, et al. An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(20):8198-203. Epub 2009/05/07.

498. Amiano N, Reiteri RM, Costa MJ, Tateosian N, Chuluyan HE. Immunotherapy with SLPI over-expressing mammary tumor cells decreases tumor growth. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2011;60(6):895-900. Epub 2011/04/27.

499. Dasgupta S, Tripathi PK, Qin H, Bhattacharya-Chatterjee M, Valentino J, Chatterjee SK. Identification of molecular targets for immunotherapy of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2006;42(3):306-16. Epub 2005/12/03.

500. Oh SK, Kim SH, Walker JE. Interference with immune response at the level of generating effector cells by tumor-associated haptoglobin. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(11):934-40. Epub 1990/06/06.

501. Engelhard M. Anti-CD20 antibody treatment of non-Hodgkin lymphomas. *Clin Immunol*. 2016. Epub 2016/08/18.
502. Anel BLA, APORTA CA, PARDO JJ, CONDE GB, MARTÍNEZ LL. Uso de la granulicina para el tratamiento de tumores sólidos. Google Patents; 2014.
503. Martinez-Lostao L, de Miguel D, Al-Wasaby S, Gallego-Lleyda A, Anel A. Death ligands and granulysin: mechanisms of tumor cell death induction and therapeutic opportunities. *Immunotherapy*. 2015;7(8):883-2. Epub 2015/09/01.
504. Gordon AN, Finkler N, Edwards RP, Garcia AA, Crozier M, Irwin DH, et al. Efficacy and safety of erlotinib HCl, an epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR) tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ovarian carcinoma: results from a phase II multicenter study. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2005;15(5):785-92. Epub 2005/09/22.
505. Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(1):77-85. Epub 2004/01/01.
506. Cohen EE, Kane MA, List MA, Brockstein BE, Mehrotra B, Huo D, et al. Phase II trial of gefitinib 250 mg daily in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(23):8418-24. Epub 2005/12/03.
507. Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A. Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2006;6(1):29-31. Epub 2006/06/27.
508. Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, et al. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(16):3238-47. Epub 2004/08/18.
509. Jackman DM, Yeap BY, Lindeman NI, Fidias P, Rabin MS, Temel J, et al. Phase II Clinical Trial of Chemotherapy-Naïve Patients \geq 70 Years of Age Treated With Erlotinib for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(7):760-6.
510. Stepanski EJ, Reyes C, Walker MS, Satram-Hoang S, Leon L, Wojtowicz-Praga S, et al. The association of rash severity with overall survival: findings from

patients receiving erlotinib for pancreatic cancer in the community setting. *Pancreas*. 2013;42(1):32-6. Epub 2012/06/16.

511. Saif MW, Merikas I, Tsimboukis S, Syrigos K. Erlotinib-induced skin rash. Pathogenesis, clinical significance and management in pancreatic cancer patients. *JOP : Journal of the pancreas*. 2008;9(3):267-74. Epub 2008/05/13.

512. Van Cutsem E, Vervenne WL, Bennouna J, Humblet Y, Gill S, Van Laethem JL, et al. Phase III trial of bevacizumab in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(13):2231-7. Epub 2009/03/25.

513. Kozuki T. Skin problems and EGFR-tyrosine kinase inhibitor. *Japanese journal of clinical oncology*. 2016;46(4):291-8. Epub 2016/01/31.

514. Fuerst D, Parmar S, Schumann C, Rudiger S, Boeck S, Heinemann V, et al. HLA polymorphisms influence the development of skin rash arising from treatment with EGF receptor inhibitors. *Pharmacogenomics*. 2012;13(13):1469-76. Epub 2012/10/13.

515. Steffens M, Paul T, Hichert V, Scholl C, von Mallek D, Stelzer C, et al. Dosing to rash?--The role of erlotinib metabolic ratio from patient serum in the search of predictive biomarkers for EGFR inhibitor-mediated skin rash. *Eur J Cancer*. 2016;55:131-9. Epub 2016/01/29.

516. Arbitrio M, Di Martino MT, Barbieri V, Agapito G, Guzzi PH, Botta C, et al. Identification of polymorphic variants associated with erlotinib-related skin toxicity in advanced non-small cell lung cancer patients by DMET microarray analysis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2016;77(1):205-9. Epub 2015/11/27.

517. Takahashi N, Yamada Y, Furuta K, Nagashima K, Kubo A, Sasaki Y, et al. Association between serum ligands and the skin toxicity of anti-epidermal growth factor receptor antibody in metastatic colorectal cancer. *Cancer science*. 2015;106(5):604-10. Epub 2015/02/25.

518. Paul T, Schumann C, Rudiger S, Boeck S, Heinemann V, Kachele V, et al. Cytokine regulation by epidermal growth factor receptor inhibitors and epidermal growth factor receptor inhibitor associated skin toxicity in cancer patients. *Eur J Cancer*. 2014;50(11):1855-63. Epub 2014/05/27.

519. Aranda E, Manzano JL, Rivera F, Galan M, Valladares-Ayerbes M, Pericay C, et al. Phase II open-label study of erlotinib in combination with gemcitabine in unresectable and/or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: relationship between skin rash and survival (Pantar study). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(7):1919-25. Epub 2011/12/14.

520. Duckett DR, Cameron MD. Metabolism considerations for kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2010;6(10):1175-93. Epub 2010/08/06.

521. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 2011;472(7344):481-5. Epub 2011/04/12.

522. Serarslan G, Okuyucu E, Melek I, Hakverdi S, Duman T. Widespread maculopapular rash due to intramuscular interferon beta-1a during the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008;14(2):259-61. Epub 2008/03/14.

523. Crow MK. Type I interferon in organ-targeted autoimmune and inflammatory diseases. *Arthritis research & therapy*. 2010;12 Suppl 1:S5. Epub 2011/02/15.

524. Collares CV, Evangelista AF, Xavier DJ, Takahashi P, Almeida R, Macedo C, et al. Transcriptome meta-analysis of peripheral lymphomononuclear cells indicates that gestational diabetes is closer to type 1 diabetes than to type 2 diabetes mellitus. *Molecular biology reports*. 2013;40(9):5351-8. Epub 2013/05/10.

525. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabef A, Tchaicha JH, Christensen CL, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer discovery*. 2013;3(12):1355-63. Epub 2013/10/01.

526. Das R, Verma R, Sznol M, Boddupalli CS, Gettinger SN, Kluger H, et al. Combination therapy with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 leads to distinct immunologic changes in vivo. *J Immunol*. 2015;194(3):950-9. Epub 2014/12/30.

527. Siegrist F, Ebeling M, Certa U. The small interferon-induced transmembrane genes and proteins. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2011;31(1):183-97. Epub 2010/12/21.

528. Zhao B, Wang H, Zong G, Li P. The role of IFITM3 in the growth and migration of human glioma cells. *BMC neurology*. 2013;13:210. Epub 2013/12/29.

529. Tanaka SS, Yamaguchi YL, Tsoi B, Lickert H, Tam PP. IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Developmental cell*. 2005;9(6):745-56. Epub 2005/12/06.

530. Yount JS, Moltedo B, Yang YY, Charron G, Moran TM, Lopez CB, et al. Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nature chemical biology*. 2010;6(8):610-4. Epub 2010/07/06.

531. Fish EN, Ghislain J, Trogadis J, Stevens JK. Inhibitory effects of alpha-interferon on epidermal growth factor-mediated receptor-dependent events. *Cancer research*. 1993;53(21):5148-57. Epub 1993/11/01.

532. Mascia F, Lam G, Keith C, Garber C, Steinberg SM, Kohn E, et al. Genetic ablation of epidermal EGFR reveals the dynamic origin of adverse effects of anti-EGFR therapy. *Science translational medicine*. 2013;5(199):199ra10. Epub 2013/08/24.

533. Li J, Wei Z, Zheng M, Gu X, Deng Y, Qiu R, et al. Crystal structure of human guanosine monophosphate reductase 2 (GMPR2) in complex with GMP. *Journal of molecular biology*. 2006;355(5):980-8. Epub 2005/12/20.

534. Wawrzyniak JA, Bianchi-Smiraglia A, Bshara W, Mannava S, Ackroyd J, Bagati A, et al. A purine nucleotide biosynthesis enzyme guanosine monophosphate reductase is a suppressor of melanoma invasion. *Cell reports*. 2013;5(2):493-507. Epub 2013/10/22.

535. Linford A, Yoshimura S, Nunes Bastos R, Langemeyer L, Gerondopoulos A, Rigden DJ, et al. Rab14 and its exchange factor FAM116 link endocytic recycling and adherens junction stability in migrating cells. *Developmental cell*. 2012;22(5):952-66. Epub 2012/05/19.

536. Prekeris R. The art of "cut and run": the role of Rab14 GTPase in regulating N-cadherin shedding and cell motility. *Developmental cell*. 2012;22(5):909-10. Epub 2012/05/19.

537. Wada K, Sato M, Araki N, Kumeta M, Hirai Y, Takeyasu K, et al. Dynamics of WD-repeat containing proteins in SSU processome components. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2014;92(3):191-9. Epub 2014/04/24.

538. Zeng GQ, Yi H, Zhang PF, Li XH, Hu R, Li MY, et al. The function and significance of SELENBP1 downregulation in human bronchial epithelial carcinogenic process. *PloS one*. 2013;8(8):e71865. Epub 2013/08/27.

539. Klein EA. Selenium and vitamin E cancer prevention trial. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1031:234-41. Epub 2005/03/09.

540. Silvers AL, Lin L, Bass AJ, Chen G, Wang Z, Thomas DG, et al. Decreased selenium-binding protein 1 in esophageal adenocarcinoma results from posttranscriptional and epigenetic regulation and affects chemosensitivity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(7):2009-21. Epub 2010/03/25.

541. Scortegagna M, Martin RJ, Kladney RD, Neumann RG, Arbeit JM. Hypoxia-inducible factor-1alpha suppresses squamous carcinogenic progression and epithelial-mesenchymal transition. *Cancer research*. 2009;69(6):2638-46. Epub 2009/03/12.

542. Weir L, Robertson D, Leigh IM, Vass JK, Panteleyev AA. Hypoxia-mediated control of HIF/ARNT machinery in epidermal keratinocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(1):60-72. Epub 2010/12/07.

543. Zhang Q, Wang Z, Hou F, Harding R, Huang X, Dong A, et al. The substrate binding domains of human SIAH E3 ubiquitin ligases are now crystal clear. *Biochimica et biophysica acta*. 2016. Epub 2016/10/25.

544. Garcia-Limones C, Lara-Chica M, Jimenez-Jimenez C, Perez M, Moreno P, Munoz E, et al. CHK2 stability is regulated by the E3 ubiquitin ligase SIAH2. *Oncogene*. 2016;35(33):4289-301. Epub 2016/01/12.

545. Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH, Reed NR, Hesse SE, Thomas CF, et al. Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(22):1606-29. Epub 2008/11/13.

546. Gao Y, Liu Y, Meng F, Shang P, Wang S, Zhang Y, et al. Overexpression of Siah2 Is Associated With Poor Prognosis in Patients With Epithelial Ovarian Carcinoma. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2016;26(1):114-9. Epub 2015/10/30.

547. Yu X, Ai J, Cai L, Jing Y, Wang D, Dong J, et al. Regulation of tumor suppressor EAF2 polyubiquitination by ELL1 and SIAH2 in prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(20):29245-54. Epub 2016/04/09.

548. Adam MG, Matt S, Christian S, Hess-Stumpp H, Haegebarth A, Hofmann TG, et al. SIAH ubiquitin ligases regulate breast cancer cell migration and invasion independent of the oxygen status. *Cell Cycle*. 2015;14(23):3734-47. Epub 2015/12/15.

549. Qin R, Smyrk TC, Reed NR, Schmidt RL, Schnelldorfer T, Chari ST, et al. Combining clinicopathological predictors and molecular biomarkers in the oncogenic K-RAS/Ki67/HIF-1alpha pathway to predict survival in resectable pancreatic cancer. *British journal of cancer*. 2015;112(3):514-22. Epub 2015/01/15.

550. Ma B, Chen Y, Chen L, Cheng H, Mu C, Li J, et al. Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. *Nature cell biology*. 2015;17(1):95-103. Epub 2014/12/02.

551. Ma B, Cheng H, Gao R, Mu C, Chen L, Wu S, et al. Zyxin-Siah2-Lats2 axis mediates cooperation between Hippo and TGF-beta signalling pathways. *Nature communications*. 2016;7:11123. Epub 2016/04/01.

552. Musyoka JN, Liu MC, Pouniotis DS, Wong CS, Bowtell DD, Little PJ, et al. Siah2-deficient mice show impaired skin wound repair. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2013;21(3):437-47. Epub 2013/05/01.

553. Jansen MP, Ruigrok-Ritstier K, Dorssers LC, van Staveren IL, Look MP, Meijer-van Gelder ME, et al. Downregulation of SIAH2, an ubiquitin E3 ligase, is associated with resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2009;116(2):263-71. Epub 2008/07/17.

