

## Caracterización molecular de los tumores de páncreas y vías biliares

### Molecular characterization of pancreatic and biliary tumors

Gimena Barroso<sup>1</sup> , Roció García Carbonero<sup>2</sup>, Gustavo Jarchum<sup>3</sup>

1. Universidad Católica de Córdoba, Facultad de Ciencias de la Salud, Sanatorio Allende.

2. Hospital Universitario 12 de octubre de Madrid España, Departamento de Oncología Digestiva.

3. Sanatorio Allende de Córdoba Argentina, Servicio de Oncohematología.

Correspondencia: Gimena Barroso. Email: gimebarroso@gmail.com

#### Resumen

**INTRODUCCIÓN:** Los tumores de páncreas y vías biliares en general se diagnostican en una etapa avanzada, cuando las opciones curativas son escasas, lo cual se traduce a altas tasas de mortalidad. La resección completa es la única cura, pero sólo un pequeño porcentaje de pacientes presentan enfermedad en estadio temprano al diagnóstico. Por otro lado, entre los pacientes que se someten a cirugía curativa, tasas de recurrencia son extremadamente altas. En el momento actual no se dispone de un tratamiento sistémico claramente efectivo más allá de la primera línea y esto hace que nuevos estudios de investigación relacionados a la biología molecular que pueda definir nuevas líneas de tratamiento dirigido sea una necesidad de urgencia en este contexto.

**OBJETIVO:** Determinar la frecuencia de las diferentes alteraciones moleculares en tumores de vía biliar y páncreas y estudiar si existe relación entre la mutación hallada y la sobrevida de los pacientes.

Evaluar el factor pronóstico de las variables de laboratorio al diagnóstico.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Estudio retrospectivo y descriptivo, en el que se incluyeron 110 pacientes con diagnóstico de tumores de vías biliares o pancreáticos, evaluados por el equipo de la unidad de tumores digestivos del Hospital 12 de octubre entre febrero 2019 hasta el mes de julio del 2020.

**RESULTADOS:** Se incluyeron 64 pacientes con diagnóstico de tumor de páncreas y 46 con tumores de vías biliares, la edad media fue de 61 años, el 43% de los pacientes se diagnosticó en estadio IV de la enfermedad, la sobrevida para los pacientes con tumores de páncreas en el periodo metastásico fue de 20 meses, 25 meses para los pacientes con tumores biliares. P53, K- ras, CDKN2A y SMAD fueron las mutaciones más frecuentemente encontradas en tumores de páncreas, ARID1A, FGFR e IDH en colangiocarcinoma intrahepático, P53 k-ras y CDKN2A en tumores extrahepáticos. Al investigar acerca de factores pronósticos, la hemoglobina y albúmina alterada al diagnóstico fueron parámetros con resultados estadísticamente significativos en relación con la sobrevida.

**CONCLUSIONES:** Los avances recientes han aclarado las características genéticas y moleculares de tumores biliopancreáticos y ofrecen el potencial para el diagnóstico de base molecular de los mismos. Sin embargo, la aplicabilidad clínica de la mayoría de los marcadores existentes es limitada debido a una falta de sensibilidad y especificidad adecuadas; se requieren estudios adicionales para validar y confirmar la utilidad clínica de algunos marcadores prometedores. Los valores de hemoglobina y albumina al diagnóstico podrían ser utilizados como factores pronósticos en pacientes con tumores pancreáticos.

**Palabras claves:** cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, mutaciones moleculares, factores pronósticos.

## Abstract

**INTRODUCTION:** Pancreatic and bile duct tumors are generally diagnosed at an advanced stage, when curative options are scarce, which translates into high mortality rates.

Complete resection is the only cure, but only a small percentage of patients have early- stage disease at the time of diagnosis. Moreover, among patients who undergo curative surgery, recurrence rates are extremely high. At present, there is no clearly effective systemic treatment beyond the first line and this makes new research related to molecular biology that can define new lines of targeted treatment an urgent need in this context.

**OBJECTIVE:** To determine the frequency of the different molecular alterations in tumors of the bile duct and pancreas and to study if there is a relationship between the mutation and the survival of patients. Additionally, to evaluate the prognostic factor of laboratory variables at diagnosis

**MATERIAL AND METHODS:** Retrospective and descriptive study, which included 110 patients with a diagnosis of tumors of the bile duct or pancreas, evaluated by the team of the digestive tumors unit of Hospital 12 de Octubre between February 2019 and July 2020.

**RESULTS:** 64 patients with diagnosis of pancreatic tumor and 46 with bile duct tumors were included, the mean age was 61 years, 43% of the patients were diagnosed in stage IV of the disease, the survival for patients with pancreatic tumors in the metastatic period was 20 months, 25 months for patients with biliary tumors. P53, K-ras, CDKN2A and SMAD were the most frequently found mutations in pancreatic tumors, ARID1A, FGFR and IDH in intrahepatic cholangiocarcinoma, P53 k-ras and CDKN2A in extrahepatic tumors. When investigating prognostic factors, abnormal hemoglobin and albumin at diagnosis were parameters with statistically significant results in relation to survival.

**CONCLUSIONS:** Recent advances have clarified the genetic and molecular characteristics of biliopancreatic tumors and offer the potential for their molecular- based diagnosis. However, the existing markers have limited applicability due to a lack of adequate sensitivity and specificity; More studies are required to validate and confirm the clinical utility of some promising markers. Hemoglobin and albumin values at the moment of diagnosis could be used as prognostic factors in patients with pancreatic tumors.

**Keywords:** pancreatic cancer, cholangiocarcinoma, molecular mutations, prognostic factors.

## Introducción

Los tumores del tracto biliar incluyen un grupo heterogéneo de cánceres, estos son el colangiocarcinoma intrahepático CCIH, el colangiocarcinoma hiliar y el colangiocarcinoma extrahepático CCEH, así como también los tumores que surgen de la vesícula biliar; mientras que anatómicamente estos tumores están relacionados, cada uno de ellos tiene una patología molecular propia y esto hace que sean un grupo con muchas variables que aún merecen un estudio más amplio.

Los tumores de páncreas, que actualmente representan la cuarta causa de muerte relacionada con cáncer en nuestro país, tienen ciertas particularidades que comparten con los tumores de vías biliares especialmente en cuanto al diagnóstico y evolución.

Se trata de tumores que por lo general se diagnostican en una etapa avanzada, cuando las opciones curativas son escasas, lo cual se traduce en altas tasas de mortalidad.

La resección completa es la única cura, pero sólo un pequeño porcentaje de pacientes presentan enfermedad en estadio temprano al diagnóstico<sup>1</sup>. Además, entre pacientes que se someten a cirugía

curativa, las tasas de recurrencia son extremadamente altas. En el momento actual no se dispone de un tratamiento sistémico claramente efectivo más allá de la primera línea<sup>2</sup>, esto hace que nuevos estudios de investigación relacionados a la biología molecular que pueda definir nuevas líneas de tratamiento sea una necesidad de urgencia en este contexto.

El tratamiento quirúrgico se asocia con alta tasa de complicaciones y el pronóstico continúa siendo malo en los casos reseccionados, por lo que es necesario seleccionar bien a los candidatos para evitar intervenciones quirúrgicas innecesarias<sup>3-4</sup>. La identificación de factores pronóstico de forma preoperatoria podría contribuir a mejorar el tratamiento de estos pacientes, orientando hacia pautas más personalizadas en función de la respuesta esperable.

Para pacientes con enfermedad irresecable se utiliza la quimioterapia paliativa, que ha demostrado mejorar la calidad de vida, así como también una mayor sobrevida en estos pacientes<sup>5,6</sup>, sin embargo, sabemos que una minoría de ellos experimentan respuestas favorables, y pocos logran sobrevivir a largo plazo. Por lo tanto, el estudio de factores

pronósticos y la identificación de nuevos agentes antitumorales en este contexto es una prioridad. Las tasas de incidencia de tumores de biliopancreas son heterogéneas a nivel mundial. En nuestro país la tasa de incidencia del cáncer de páncreas es de aproximadamente 4878 casos anuales, siendo el noveno en frecuencia; por otro lado, el cáncer hepático (incluyendo tumores biliares) presenta una incidencia de 2343 casos por año. El cáncer de páncreas es la cuarta causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres.

En España<sup>7</sup> el cáncer de páncreas ocupa el octavo lugar dentro de los cánceres más frecuentes con 8338 casos reportados en 2020, siendo la tercera causa de muerte por cáncer con 7120 muertes publicadas en el último censo; mientras que se registraron 6595 casos anuales de cáncer de hígado, ocupando el noveno lugar en frecuencia, y se informaron 2975 casos de tumores de vesícula biliar<sup>8</sup>.

Para los pacientes con tumores de vías biliares y de páncreas avanzados, la tasa de supervivencia a los 5 años es inferior al 10%; siendo la supervivencia media menor a 11 meses en ambos grupos, a pesar de haber recibido tratamiento con quimioterapia<sup>9</sup>.

La incidencia aumenta con la edad, presentando la mayoría de los pacientes edades comprendidas entre los 50 – 70 años, con un pico entre la séptima y octava década de la vida y en relación al sexo, es ligeramente más frecuente en los varones que en las mujeres<sup>10</sup>.

En los últimos años el avance de la tecnología ha permitido un estudio más amplio genoma lo que proporciona una nueva visión de la comprensión molecular de tumores, identificando así posibles biomarcadores para uso clínico. Además, considerando el limitado beneficio de la quimioterapia convencional en el manejo de tumores irsecables o metastásico en este contexto, la identificación de biomarcadores específicos ayudará a guiar las terapias emergentes dirigidas a moléculas y la medicina personalizada.

La terapia dirigida tiene como objetivo mejorar la eficacia terapéutica, especialmente en aquellos pacientes refractarios a quimioterapia convencional en primera línea. Los fármacos que se utilizan son diferentes a los de la quimioterapia tradicional; Este tipo de tratamiento actúa dirigiéndose a dianas o proteínas específicas que se encuentran en células cancerosas o en células relacionadas con el desarrollo del cáncer, para ayudar a detenerlo y evitar la propagación de la enfermedad.

Entrectinib es un potente inhibidor de las tirosinas quinasas codificadas por el gen NTRK1, ROS1 y ALK.

Los miembros de la familia de tirosinas quinasas juegan un papel clave en el desarrollo y diferenciación normal de las células, regulando la supervivencia (o la prevención de la muerte celular programada) y manteniendo la función de células en todo el cuerpo. Las alteraciones de las quinasas ocurren debido a mutaciones genéticas, sobreexpresión, variantes de empalme y reordenamientos de genes, y están asociados con varios tipos de cáncer en humanos.

Finalmente, estas mutaciones dan como resultado una quinasa constitutivamente activa que proporciona la fuerza impulsora para la transformación y progresión tumoral a través de la transmisión de señales de crecimiento y supervivencia<sup>11-12</sup>.

## Objetivos

Determinar la frecuencia de las diferentes alteraciones moleculares en tumores de vía biliar y páncreas.

Estudiar si existe relación entre la mutación hallada y la sobrevida de los pacientes.

Objetivos secundarios

Evaluar el factor pronóstico de las variables de laboratorio al diagnóstico.

## Materiales y métodos

Se trata de un estudio retrospectivo y descriptivo, en el que se seleccionaron 110 pacientes con diagnóstico de tumores de vías biliares o pancreáticos, evaluados por el equipo de la unidad de tumores digestivos del Hospital 12 de Octubre en Madrid, España.

El punto de partida ha sido el estudio GO40782 (RXDX-101-02) abierto, multicéntrico, global, en fase II que evaluaba la eficacia de Entrectinib para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos localmente avanzados o metastásicos que albergaran reordenamientos en los genes NTRK1/2/3, ROS1 o ALK.

En todos los pacientes, tejido adicional (en el momento de la progresión, si era clínicamente factible y el paciente había dado su consentimiento para la biopsia) se utilizó para identificar otros reordenamientos o alteraciones moleculares que pudieran predecir la actividad de Entrectinib y conocer los posibles mecanismos de resistencia.

El estado mutacional de los genes NTRK1 / 2/3, ROS1 y ALK, entre otros, se controlaron en

ácidos nucleicos aislados del plasma utilizando secuenciación de próxima generación.

A partir de ello se ofreció a los pacientes enrolarse para un estudio de secuenciación genética con el objetivo de conocer el perfil genético completo de estos tumores, así como si presentaban algunas otras características relevantes como IMS (inestabilidad microsatelital) y conocer el TMB (tumor mutational burden) de los mismos; se incluyeron pacientes de otros hospitales que fueron referidos a la institución para evaluar si podrían considerarse candidatos a ensayos clínicos que se encontraran disponibles según su patología.

Según la base de datos de pacientes que accedieron a estudios de secuenciación genética, realizamos una revisión de las historias clínicas de aquellos que presentaron diagnóstico de tumores biliopancreáticos evaluados entre febrero 2019 hasta el mes de julio del 2020.

A partir del relevamiento de estas variables se procede a confeccionar una base de datos en una planilla de Excel para su posterior análisis.

Para cada paciente se recogieron las siguientes variables entre otras: genero, edad al momento del diagnóstico, estadio de la enfermedad según el sistema de estadificación tumor, ganglio linfático, metástasis (TNM), fecha del diagnóstico de la enfermedad, origen de la muestra tumoral (primario vs metástasis), terapia oncológica aplicada y número de líneas de tratamiento, inclusión en un ensayo clínico, respuesta obtenida a los tratamientos aplicados, valores de laboratorio al diagnóstico y fecha de defunción o de última consulta.

### Consideraciones éticas

El trabajo se condujo según las buenas prácticas clínicas adheridos a los principios de enmienda de la declaración de Helsinki y Buenas Prácticas Clínicas y de acuerdo con la Ley de la Provincia de Córdoba (Argentina) sobre Investigación en seres humanos n° 9694/09. Se garantizó la confidencialidad de la información según la Ley Nacional de Protección de datos personales n° 25326/00.

### Análisis estadístico

El análisis de los datos clínicos y demográficos fue expresado como medias y desviación estándar para variables continuas o como frecuencias y porcentajes para variables categóricas.

Se realiza la descripción de nuestra población estudiada mediante tablas y graficas de frecuencias y porcentajes.

Se utilizó el software R-Medic<sup>13</sup>. Se calcularon media y desvío estándar para las variables cuantitativas y porcentajes para las variables categóricas.

Se aplicó test t o test de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos. Para análisis de sobrevida, se calculó mediana y se aplicó Test de Kaplan -Meier.

Los valores de p < 0,05 fueron considerados significativos.

## Resultados

La población en estudio estaba formada por 110 pacientes, 58 eran hombres y 52 mujeres, con una media de edad de 61 años (rango 37-82 años). De la totalidad de pacientes 64 tenían diagnóstico de cáncer de páncreas, de ellos 35 (55%) correspondían a tumores de la cabeza del páncreas, 18 (28%) se localizaban en el cuerpo y 6 (9%) en la cola, de 5 (8%) pacientes no tuvimos datos de la localización tumoral. De los 46 pacientes con diagnóstico de tumor de vías biliares la distribución según localización era de CCIH en 25 pacientes (54%), CCEH en 17 (37%), y vesícula biliar en 4 (9%).

Un total de 43 pacientes fueron diagnosticados en estadio IV, de estos pacientes 33 eran tumores de páncreas y 10 de vías biliares. Del total de pacientes que realizaron tratamiento en etapa avanzada: 29 (26%) recibieron 1 solo esquema, 24 (22%) pacientes realizaron 2 líneas de tratamiento y 24 (22%) pacientes 3 líneas o más. No hay datos de 18 pacientes que siguieron su tratamiento en otras instituciones. 14 pacientes fueron incluidos en estudios de ensayo de primera línea y 17 fueron incluidos a la recaída en ensayos de segunda línea de tratamiento.

El resto de los datos se resumen en la (Tabla 1)

**Tabla 1.** Características generales de los pacientes incluidos en el estudio, cantidad de pacientes con mutaciones de TMB y porcentaje de pacientes que presentaban IMS.

(ref. SD: sin dato, NE: no estudiado.)

Características	Todos los pacientes n = 110	Páncreas n = 64	Colangiocarcinoma n = 46
Edad	61 (37-82)	40 (37-78)	63 (44-82)
Genero			
Masculino	58 (53%)	33 (51%)	25 (54%)
Femenino	52 (47%)	31 (49%)	21 (46%)
Muestras de estudio			
Primario	90 (82%)	47 (73%)	43 (93%)
Metástasis	20 (18%)	17 (27%)	3 (7%)
Possibilidad quirúrgica al diagnóstico			
Resecable	40 (35%)	30 (47%)	30 (65%)
No Resecable	70 (65%)	34 (53%)	16 (35%)
Número de líneas de tratamiento			
0	15 (14%)	8 (13%)	7 (15%)
1	29 (26%)	17 (27%)	12 (26%)
2	24(22%)	16 (25%)	8 (18%)
3	18 (16%)	14 (22%)	4 (9%)
4	3 (3%)	2 (3%)	1 (2%)
5	3 (3%)	1 (1%)	2 (4%)
SD	18 (17%)	6 (9%)	12 (26%)
TMB			
0	10 (9%)	5 (8%)	6 (13%)
1-5	52 (47%)	31(48%)	14 (30%)
5 - 10	13 (12%)	6 (10%)	14 (30%)
>10	2 (2%)	0	2 (4%)
NE	33 (30%)	22 (34%)	10 (23%)
IMS			
IMS H	75 (68%)	43 (67%)	32 (70%)
IMS N	2 (2%)	0	2 (4%)
SD	33 (30%)	21 (32%)	12 (26%)

### Características de la población con tumor de páncreas

Del total de pacientes solo cinco fueron elegibles para realizar tratamiento neoadyuvante, en este contexto el esquema más utilizado fue gemcitabina – abraxane en 4 pacientes y folfirinox (ácido folínico, fluorouracilo 5-FU, clorhidrato de irinotecán y oxaliplatino) en 1 paciente.

Por otra parte 30 pacientes fueron operados de su tumor primario y de estos 24 realizaron adyuvancia, de los cuales 22 presento recaída de la enfermedad y fueron asignados a terapia de primera línea de tumores avanzados, los esquemas de tratamiento más utilizados en este escenario fueron folfirinox y gemcitabina-abraxane.

Del total de pacientes ingresaron a primera línea de tratamiento dentro de ensayos clínicos 9 pacientes.

Es interesante destacar que de los pacientes que presentaron recaídas a primera línea, 14 de ellos fueron asignados a ensayos clínicos y de los que realizaron quimioterapia de segunda línea los esquemas gemcitabina-abraxane, folfox (ácido folínico en combinación con fluoruracilo y oxaliplatino) y folfiri (fluoruracilo en combinación con irinotecan) fueron los tratamientos más elegidos.

La cantidad de líneas que realizaron los pacientes fue variable, la mitad de los pacientes alcanzo a realizar por lo menos 2 líneas de tratamiento.

### Características de la población con tumor de vías biliares

Treinta pacientes de este grupo recibieron como primera intención de tratamiento una cirugía, de estos pacientes solo 16 realizo adyuvancia; y del total de pacientes operados 20 presento recaída de la enfermedad dentro del primer año y fueron asignados a terapia de primera línea en tumores avanzados, el esquema de tratamiento más utilizado fue platino con gemcitabina.

Del total de pacientes 5 realizaron ensayos clínicos de primera línea.

De los que presentaron recaída a primera línea de tratamiento ingresaron a ensayos clínicos de segunda línea solo 3 pacientes y de los que se sometieron a quimioterapia el esquema folfox fue el más utilizado.

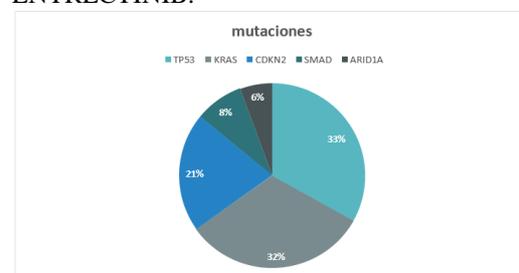
La cantidad de líneas que realizaron los pacientes fue variable, el 50% de los pacientes realizo 2 líneas de tratamiento.

### Clasificación molecular del cáncer de biliopancreas

Actualmente gracias a las nuevas técnicas de secuenciación se ha podido profundizar en el conocimiento de la biología molecular de los tumores, y de los trastornos genéticos acompañantes que originan alteración del ciclo celular, aumento de la supervivencia celular, invasión y metástasis.

Del total de pacientes estudiados, 65 presentaron mutación en el gen supresor de tumores TP53, 62 pacientes en el gen KRAS, 41 en el gen CDKN2 implicado en la regulación del ciclo celular, 17 mutaciones en SMAD4 y finalmente 12 pacientes tuvieron alguna alteración en el gen que interviene en la regulación de la cromatina ARID1A. (Figura 1)

De los pacientes evaluados ninguno presento reordenamientos en los genes estudiados, NTRK1/2/3, ROS1 o ALK, pasibles de recibir tratamiento con la droga de prueba ENTRECTINIB.



**Figura 1.** Representación en porcentaje de las mutaciones más frecuentes en tumores de biliopancreas

### Clasificación molecular de cáncer de vías biliares

En las muestras correspondientes a tumores de vía biliar intrahepática, la alteración molecular más frecuentemente fue la mutación ARID1A (7 de 17 pacientes, lo que representa aproximadamente un 40%), con la existencia de un paciente con la misma mutación en tumores de vía biliar extrahepático y ninguno en tumores de vesícula biliar. Las isoformas fueron variadas sin predominancia de alguna en particular, otras alteraciones relevantes en este grupo fueron TP53 que se encontró alterado en 5 pacientes, luego FGFR en 4 pacientes y finalmente IDH en 3 de ellos.

En las muestras de tumores de vías biliares extrahepáticas la alteración molecular más frecuente fue la mutación de TP53 en 10 pacientes, representando un 40% del total de pacientes, luego KRAS en segundo lugar encontrada en 8 pacientes con una predominancia importante respecto a CCIH donde solo 1 paciente tenía un KRAS mutado. Hubo 7 pacientes con alteración de genes

implicados en la regulación del ciclo celular (5CDKN2A y 2 CDKN2B).

En genes relacionados con la reparación del ADN hubo 2 pacientes con BRCA mutado y 1 paciente con alteración ATM.

En las muestras de VB, la alteración molecular más frecuentemente observada fue la mutación TP53 en 3 pacientes y en segundo lugar FGFR que afectaba a 2 pacientes de los 4 que pudimos reclutar con este tumor (Tabla 2).

**Tabla 2.** Alteraciones moleculares halladas en tumores de vía biliar según localización del tumor.

Alteración molecular	CCEH	CCIH	V	N total	
				B	
Total de pacientes	25	17	4	4	46
IDH	0	3	0	0	3
ARID1A	1	7	0	0	8
FGFR	0	4	2	0	6
PI3K	2	0	0	0	2
AKT	0	1	0	0	1
PTEN	2	0	0	0	2
KRAS	8	1	0	0	9
NRAS	1	1	0	0	2
BRAF	0	1	0	0	1
MDM	1	0	1	0	2
REPARACION (BRCA2, ATM, MSH2, MSH6)	2 BRCA	1 ATM	0	0	3
TP53	10	5	3	0	18

El análisis genómico muestra alteraciones específicas en cada localización tumoral.

### Clasificación molecular de cáncer de páncreas

La evaluación de los tumores de páncreas reveló que la alteración más frecuente es la mutación KRAS, que se mostró alterada en 53 pacientes de 64 estudiados, (83%), las isoformas más frecuentes fueron G12D en 25 pacientes, G12R en 11 y G12V en 10 muestras; luego se encontraron otras mutaciones que se describen a continuación en orden de frecuencia: mutación TP53 en 45 pacientes, CDKN2A alterado en 25 pacientes, 18 mutados y 7 los; SMAD se encontró alterado en 11 pacientes sin importancia significativa de la localización del tumor, CDKN2B en 7 pacientes, ARID1A se encontró mutado en 4 pacientes con la misma predominancia de la mutación ERBB2, y finalmente MUTYH en 3 pacientes con tumores localizados en la cabeza del páncreas. (Tabla 3).

**Tabla 3.** Alteraciones moleculares halladas en tumores de páncreas.

Alteración molecular	CABEZA	CUERPO	COLA	SD	N total
Total de pacientes	36	17	6	5	64
IDH	0	0	0	0	0
ARID1A	3 mut	0	1 dupl	0	4
FGFR	1 mut	1 ampl	0	0	3
PI3K	1 mut	2 mut	0	0	3
	1 ampl				
AKT	1 ampl	2 ampl	0	0	3
KRAS	31	12	5	5	53
NOTCH	1	0	0	0	1
MET	1	0	0	0	1
MDM	1 ampl	0	0	0	1
REPARACION (BRCA2, ATM, MSH2, MSH6)	1 brca	1 brca	1 atm	0	4
	3 atm				
TP53	27	13	2	3	45

### Resultados de sobrevida

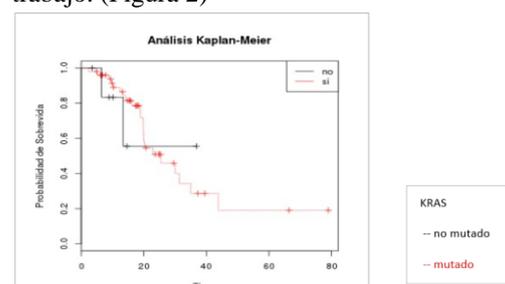
La supervivencia global (SG) fue de 30 meses para todos los pacientes. La mediana fue de 25 meses para los pacientes con tumores de páncreas y de 34 meses para los tumores de vías biliares. No se obtuvieron datos de sobrevida de 8 pacientes.

La supervivencia del periodo metastásico fue de 20 meses para todos los pacientes, 14 meses para pacientes con tumores de páncreas y 25 meses para colangiocarcinoma.

La sobrevida libre de progresión (SLP) a la primera línea de quimioterapia fue de 4 meses para todos los pacientes.

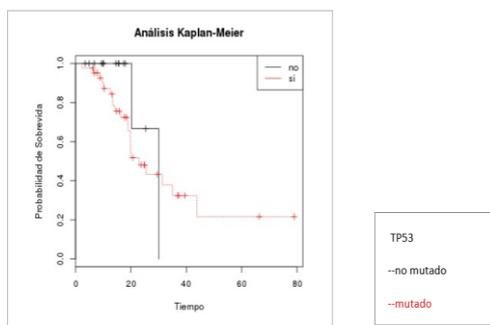
En tumores de vías biliares la SG en función de la localización anatómica fue la siguiente: 25 meses en el grupo de CCIH, 34 meses en el grupo de pacientes con CCEH. La SG en relación con las mutaciones halladas no fue estadísticamente significativa para los tumores de vías biliares.

En tumores de Páncreas se obtuvieron datos de sobrevida de los pacientes en relación con mutaciones de KRAS y TP53 que fueron las más frecuentes, teníamos datos de 50 pacientes con KRAS mutado entre los cuales hubo 22 pacientes fallecidos (44%), con una mediana de sobrevida de 25 meses. Entre los pacientes que no presentaban esta mutación solo el 28% había fallecido al informar los resultados de nuestro trabajo. (Figura 2)



**Figura 2.** Sobrevida de pacientes con KRAS mutado en tumores de páncreas

Respecto a los datos de supervivencia de pacientes con cáncer de páncreas y mutación de tp53 teníamos datos de 42 pacientes, exactamente el 50% de los pacientes mutados había fallecido, con una mediana de supervivencia de 23 meses; mientras que entre los 14 pacientes que no presentaron la mutación solo hubo 2 exitus (14%) durante un seguimiento de 30 meses. (Figura 3)



**Figura 3.** Gráfico de supervivencia de los pacientes con mutaciones de TP53 en tumores de páncreas.

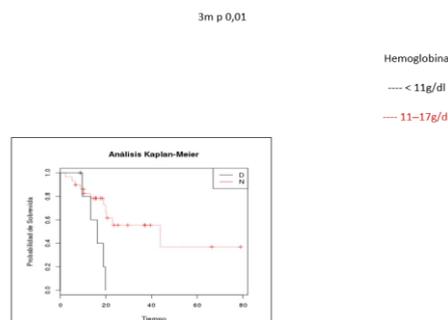
Se analizó también el comportamiento de la población que presentó mutación ARID1A en tumores de páncreas, donde obtuvimos 25 pacientes que tenían la mutación y de los cuales, 11 fallecieron, que corresponderían a un 44% con una mediana de supervivencia de 23 meses, sin diferencia significativa con los pacientes que no presentaron esta alteración genética de los cuales el 40% presentó exitus con una mediana de supervivencia de 25 meses.

### Relación entre valores de laboratorio al diagnóstico y su utilización como factores pronósticos

Se analizaron valores de hemoglobina, neutrófilos, linfocitos, LDH, FAL, albumina y bilirrubina, también se incorporó a estos datos los valores de marcador tumoral CA

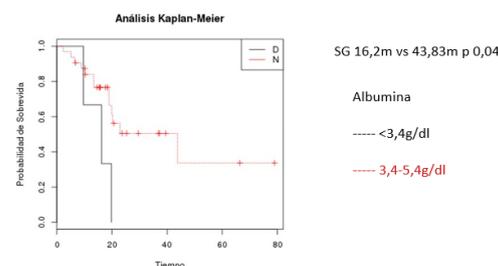
19.9 que tenían los pacientes al diagnóstico y se investigó si estas variables se relacionaban o no con la supervivencia.

Respecto a los resultados que se obtuvieron pudimos observar que en tumores de páncreas cuando los pacientes tenían una hemoglobina menor a 12 g/dl al diagnóstico presentaron una supervivencia menor que aquellos que tenían hemoglobina dentro de valores normales. El valor de  $p$  0.01. (Figura 4)



**Figura 4.** Curva de supervivencia en relación a la hemoglobina

Otro hallazgo interesante fue relacionado con los valores de albumina en la cual se analizó la supervivencia de aquellos que se encontraban dentro del rango normal entre 3.4 a 5.4 g/dL o por debajo de estos valores, y se encontró una diferencia significativa respecto a la supervivencia de ambos grupos, aquellos que tenían valores por debajo de lo normal habían fallecido el 100% al momento del análisis, con un valor de  $p$  significativo de 0.04. (Figura 5)



**Figura 5.** Curva de supervivencia en relación a la albumina.

### Valores de laboratorio y supervivencia en tumores de vías biliares

En el análisis de supervivencia de tumores de vías biliares en relación con parámetros de laboratorio al diagnóstico de la enfermedad, no se alcanzó la mediana de supervivencia de los pacientes al realizar el análisis final de este trabajo, por lo que en este estudio no podemos concluir si estas variables tendrían implicancias significativas en la supervivencia.

### Descripción de la población que participo en ensayos clínicos

Del total de pacientes 31 participo en ensayos clínicos para tratamiento de su enfermedad, 8 de los pacientes que presentaban diagnóstico de tumores de vía biliar y 23 en ensayos para pacientes con tumores de páncreas.

En referencia a los pacientes con tumor de vías biliares, se estudia principalmente la asociación de quimioterapia con inhibidores de TKI o anticuerpos monoclonales.

En pacientes con tumores de páncreas, en primera línea existen múltiples trabajos en curso, que estudian terapias dirigidas a claudinas, STAT 3, mesotelinas como así también se encuentran en curso estudios con inhibidores de ciclinas en combinación con quimioterapia; en segunda línea los estudios se dirigen a la utilización de anticuerpos monoclonales asociados o no con quimioterapia.

### **Estrategias terapéuticas dirigidas contra alteraciones moleculares específicas**

Diferentes estudios han investigado la combinación de diferentes agentes quimioterápicos con terapias moleculares, pero lamentablemente gran parte de estos ensayos no han sido exitoso, sin embargo, gracias a un conocimiento más profundo de las vías de señalización involucradas en los tumores de biliopancreas, en el momento actual están en desarrollo nuevos fármacos dirigidos con resultados prometedores.

### **Discusión**

El paradigma para el manejo del cáncer de páncreas metastásico no ha cambiado en las últimas décadas y la quimioterapia citotóxica sigue siendo el pilar del tratamiento. A pesar del hecho de que la medicina de precisión representa un cambio potencial en la forma en que se tratan los cánceres, su uso está limitado en el cáncer de páncreas y vías biliares por la baja frecuencia de objetivos accionables asociados a este tipo de tumores.

Hace más de dos décadas, la gemcitabina fue aprobado como terapia estándar para el cáncer de páncreas metastásico, con una mejor supervivencia general y beneficio clínico (control del dolor local y un perfil de seguridad favorable) en comparación con el 5-FU<sup>14</sup>. Es a partir de 2011, cuando el panorama del tratamiento cambió basado en el ensayo ACCORD 11 en el que FOLFIRINOX fue superior a gemcitabina sola (tasa de respuesta, 31,6% frente a 9,4%; mediana de supervivencia, 11,1 frente a 6,8 meses; tasa de supervivencia a 1 año, 48,4% vs 20,6%), aunque a expensas de una mayor toxicidad<sup>15</sup>.

Luego un ensayo de fase III llamado MPACT evaluó paclitaxel unido a albúmina (Nabpaclitaxel) más gemcitabina frente a gemcitabina en el adenocarcinoma metastásico

de páncreas, se publicó en 2013 y demostró un beneficio de SG para la combinación, con una mejora significativa en la mediana de SG de 6,7 a 8,5 meses y en la tasa de respuesta del 7% al 23%<sup>16</sup>.

La mediana de SG para pacientes con cáncer de páncreas metastásico se ha mantenido en aproximadamente 1 año durante la última década, a pesar de todos los avances científicos que se han producido con los agentes citotóxicos<sup>17</sup>.

Varios ensayos han evaluado la monoterapia como tratamiento de segunda línea y han demostrado un aumento de la SG<sup>18-19</sup>. La combinación de LV, 5-FU y oxaliplatino (FOLFOX) o de LV, 5-FU e irinotecan (FOLFIRI) se utiliza comúnmente para el rescate<sup>20</sup>. Sin embargo, los datos de alta calidad para respaldar el uso de regímenes terapéuticos estándar en el entorno de segunda línea fueron limitados hasta la reciente aprobación del irinotecán nanoliposomal (nal-IRI). En el estudio de fase III NAPOLI 1 la mediana del beneficio de SG fue de 6,1 meses para la combinación de nal-IRI y 5-FU / LV en comparación con 4,2 meses para el grupo de control de 5-FU / LV, con un índice de riesgo de 0,68 que se tradujo en una reducción del 32% en el riesgo de mortalidad<sup>21</sup>.

En tumores biliares la quimioterapia estándar continúa siendo el tratamiento principal en el escenario metastásico. El avance terapéutico más notable en este contexto fue la publicación de Valle et al<sup>22</sup> del ensayo clínico de fase III en el que se compara cisplatino y gemcitabina con gemcitabina monoterapia, dicho estudio demostró una SG de 11,7 meses vs 8,1 meses en monoterapia, con un HR de 0,64. La mediana de SLP fue superior en el brazo de la combinación 8,0 meses vs 5,0 meses.

Las necesidades clínicas actuales en este contexto se centran en la búsqueda de nuevas herramientas para un diagnóstico precoz y adecuado, así como novedosas opciones terapéuticas basadas en los mecanismos moleculares subyacentes de la tumorigénesis

Si analizamos la situación en tumores de páncreas, se ha demostrado en varios estudios, una frecuencia de mutaciones de K-ras que ronda entre el 75-95% de los tumores en los trabajos publicados<sup>23-24</sup>, lo que con lleva una activación por «aumento de función» con efectos carcinógenos; además es el tumor humano que presenta con mayor frecuencia una mutación de este gen<sup>25,26</sup>.

Tada M. en un antiguo estudio del año 1990 encontró que mutaciones del gen Ras estaban presentes en el 100% de los adenocarcinomas de páncreas estudiados por PCR para descubrir

frecuencia de mutaciones de este gen. Las mutaciones se encontraron en todos en el codón 12 del gen K-ras<sup>27</sup> con resultados similares a dos estudios previos<sup>28,29</sup>.

Ohashi et al<sup>30</sup> identificaron mutaciones de K-ras en el 67% de los colangiocarcinomas extrahepáticos, siendo más prevalentes en esta localización que en otras áreas de la vía biliar tal como se mencionó anteriormente.

En un estudio europeo realizado en el año 2000 las mutaciones de K-ras estuvieron presentes en el (33%) de las muestras de colangiocarcinoma y fueron significativamente más frecuentes en mujeres<sup>31</sup>.

Rashid et al<sup>32</sup>, describen que las mutaciones de k-ras influyen en los datos de supervivencia, pues la media de supervivencia de pacientes con carcinoma de vías biliares y mutación del gen del K-ras fue de 3,0+/- 2,2 meses; mientras que en los pacientes que no tenían presente esa mutación la supervivencia fue de 15,5+/- 12,5 meses con fuerte significación estadística.

Si nos referimos al gen p53, hoy sabemos que cerca del 75% de los tumores de páncreas presentan algún tipo de inactivación estructural y/o funcional del mismo y así lo demuestran varios estudios<sup>33-36</sup>.

La sobreexpresión de p53 ha estado presente entre el 19% y el 66% de los casos notificados de colangiocarcinoma<sup>37-39</sup>. En un estudio llevado a cabo en Japón y Tailandia, la incidencia de mutaciones de p53 fue similar en los dos grupos de CC (33% y 35%, respectivamente)<sup>40</sup>. Por otro lado, está asociado con una menor supervivencia con independencia de otros factores clínico-patológicos en el cáncer de vías biliares<sup>41,42</sup>.

Aparentemente el sitio del tumor puede desempeñar un papel en la incidencia de sobreexpresión de p53, siendo menor en tumores intrahepáticos y mayor en cánceres de vías biliares distales<sup>43</sup>.

En un estudio realizado en Estados Unidos en el año 2018, se detectó acumulación de proteína p53 en (50%) de los colangiocarcinomas estudiados. La supervivencia global en los pacientes que presentaron mutaciones de p53 tuvieron una mediana de 9 meses, en contraste con pacientes que no presentaban esta mutación y en quienes la SG fue de 29 meses; mientras que en los pacientes que presentaron alteración de k-ras fue de 5 vs 24 meses para pacientes con K-ras wild type<sup>44</sup>.

Diamantis et al<sup>45</sup> reportaron en colangiocarcinomas una mediana de supervivencia de 26 meses en pacientes con tumores negativos para p53, versus sólo 5 meses en pacientes con tumores positivos para p53<sup>46</sup>. Sin embargo, otros investigadores no han

demostrado relación entre la expresión de p53 y la supervivencia en este tipo de tumores<sup>47</sup>.

Respecto a BRAF en la bibliografía se encontraron hasta en un 22% de colangiocarcinomas, en contraste con nuestro trabajo en que solo fue hallado en 1 paciente, de todas formas, en estudios previos no pudo observarse una correlación entre esta mutación y el pronóstico de los pacientes<sup>48</sup>.

Tanto los tumores de vías biliares como pancreáticos comparten alteraciones genéticas en los genes implicados en la regulación del ciclo celular (CDKN2A) y en la remodelación de la cromatina (ARID1A)<sup>49</sup>.

El colangiocarcinoma intrahepático de forma característica presenta translocaciones en FGFR<sup>50</sup>, mutaciones en IDH 1-2<sup>51</sup>; Mientras que los colangiocarcinomas extrahepáticos se caracterizan por una mayor frecuencia de mutaciones previamente mencionadas como lo son K-ras y p53.

Las mutaciones en los genes de la isocitrato deshidrogenasa (IDH 1-2) están descritas con mayor frecuencia en los colangiocarcinomas intrahepáticos (entre 10- 45% de los casos) y más raramente en extrahepático y de vesícula biliar<sup>52</sup>. Se ha observado que las mutaciones en IDH son mutuamente excluyentes con las de K-ras<sup>53</sup>.

En un estudio realizado en Barcelona la alteración molecular más frecuentemente observada en colangiocarcinomas Intrahepáticos fue de IDH, en 21,8% de los pacientes, siendo estadísticamente significativa; Otro hallazgo del mismo estudio fue la alteración FGFR en el 6% de los pacientes y mutaciones de ARID1A en el 4%.

Estos autores encontraron en las muestras de colangiocarcinomas extrahepáticos que las alteraciones más frecuentes ocurrieron en K-ras, coincidiendo con el resto de la bibliografía estudiada, y en las muestras de vesícula biliar la alteración más frecuente fue HER 2 en el 16% de los pacientes con significancia estadística,

La vía FGFR está implicada en varios procesos celulares claves tales como la proliferación celular, supervivencia, migración y angiogénesis<sup>54,55</sup>. Las alteraciones genéticas de esta vía pueden iniciar tumorigénesis. El hepatocarcinoma está relacionado con la sobreexpresión de FGFR4<sup>56,57</sup>. En el colangiocarcinoma intrahepático se han observado entre 13-14% de alteraciones de este gen<sup>58</sup>, siendo más comunes en mujeres, relacionado con una mejor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global<sup>59</sup>.

Respecto a genes modificadores de la cromatina, Jiao et al<sup>60</sup>, llevaron a cabo la secuenciación del exoma en 32 casos de colangiocarcinomas

Intrahepáticos y describieron por primera vez mutaciones ARID1A en el 14 % de las muestras. El gen CDKN2A presenta verdadera importancia, ya que codifica p16 (supresor de tumores bien conocido debido a su papel en la progresión a través del punto de control del ciclo celular G1<sup>61</sup>. evitando la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, que produce una inhibición aguas abajo del factor de transcripción E2F) y además tiene efectos reguladores negativos sobre el crecimiento, ya que sirve para estabilizar p53 que al ser activado interactúa con varios objetivos aguas abajo que pueden detener las quinasas dependientes de ciclina en los puntos de control G1 y G2, así como iniciar la apoptosis.

Fueron Lynch y Krush quienes lo observaron por primera vez en 1968, y quienes describieron que la incidencia de cáncer de páncreas aumenta en muchas familias afectadas por síndromes de melanoma hereditario. En los análisis genéticos de estas familias, del 20 al 40% de la susceptibilidad aumentada al melanoma hereditaria se puede relacionar con mutaciones del gen CDKN2A (p16 / Ink4) ubicado en el cromosoma 9p21<sup>62-65</sup>.

Se ha informado que la expresión de CDKN2A es aberrante en ~ 95% de los adenocarcinomas pancreáticos, y aproximadamente el 15% de ellos<sup>66</sup> y el 24,6% en otro estudio<sup>67</sup> se atribuyeron a hipermetilación del promotor. El gen CDKN2A está metilado de forma anormal en el 27% de las líneas celulares de cáncer de páncreas<sup>68</sup>. Además, la mutación de CDKN2A ocurrió el 11,8% de las veces en pacientes con cáncer de páncreas hereditario<sup>69</sup>.

Muchos estudios han demostrado que la delección o mutación de SMAD4 es un factor pronóstico negativo para tumores pancreáticos<sup>70</sup>.

Las mutaciones de TP53 y la pérdida de SMAD4 ocurren principalmente en tumores agresivos y pueden ser marcadores de alto potencial metastásico<sup>71,72</sup>.

Tanto las delecciones como las mutaciones de SMAD4 contribuyen a la inactivación del mismo y el papel de SMAD4 en la progresión del cáncer solo se ha informado parcialmente<sup>73,74</sup>. Algunos investigadores han informado que la delección de SMAD4 es más común en tumores tempranos o resecables<sup>75</sup>.

En una revisión sistemática llevada a cabo en el año 2020 que evaluaba el valor pronóstico de las mutaciones conductoras en K-ras, CDKN2A / P16, TP53 y SMAD4 en cáncer de páncreas, se demostró que todos estos genes alterados tuvieron una supervivencia global más pobre, excepto en el grupo con afectación de CDKN2A; lo cual respalda el uso de mutaciones impulsoras

en P53, SMAD4 y genes K-ras como marcadores de pronóstico del cáncer de páncreas<sup>76</sup>.

En los seres humanos se han identificado varios genes (MLH1, MSH2, PMS1, MMS2, etc.) cuyos productos proteicos actúan de manera coordinada y secuencial en la reparación del ADN “desparejado”. El hallazgo de una elevada inestabilidad de microsátélites (IMS) es una posibilidad técnica que permite demostrar la existencia de eventos mutacionales en los genes reparadores de ADN. Por el momento son muy escasos los estudios genéticos más exhaustivos al respecto, aunque se sospecha la pérdida de expresión de la proteína MLH1 en algunos casos<sup>77-81</sup>.

En un estudio realizado en Madrid existió correlación estadísticamente significativa ( $p=0.039$ ) entre los niveles de hemoglobina al diagnóstico y la supervivencia global. Al establecer un punto de corte en 12 g/dl, la supervivencia global fue significativamente menor en pacientes con valores de hemoglobina menores a ese parámetro ( $p=0.0006$ ).

Igualmente se observó una tendencia a la relación entre bajos niveles séricos de albúmina y una menor supervivencia ( $p=0.069$ ), con coeficiente de correlación de 0.452. Con un punto de corte en 2.8 g/dl (límite inferior del intervalo de normalidad en nuestro laboratorio), la supervivencia global fue significativamente menor en pacientes con albúmina inferior a ese nivel ( $p=0.021$ )<sup>82</sup>.

En la literatura pudimos encontrar algunos otros trabajos que adjudican asociación entre los niveles de hemoglobina al diagnóstico y la supervivencia global y libre de enfermedad en el cáncer de páncreas<sup>83</sup>.

Respecto a los valores de LDH y su relación con la sobrevida de los pacientes, un trabajo realizado en Italia en el año 2016 mostró una mejora estadísticamente significativa de SLP y DCR en pacientes con niveles bajos séricos de LDH pretratamiento en comparación con pacientes con niveles elevados de LDH antes del tratamiento<sup>84</sup>. Esto no pudo ser demostrado en nuestro trabajo.

## Conclusión

El diagnóstico temprano es imperativo para mejorar los resultados del paciente. Los avances recientes han aclarado las características genéticas y moleculares de tumores biliopancreáticos y ofrecen el potencial para el diagnóstico de base molecular de los mismos. Sin embargo, la aplicabilidad clínica de la mayoría de los marcadores existentes es limitado debido a una falta de sensibilidad y especificidad

adecuadas; se requieren adicionales para validar y confirmar la utilidad clínica de algunos marcadores prometedores.

Aunque existen investigaciones recientes sobre biomarcadores de pronóstico para tumores biliares y pancreáticos lo cual es alentador, estudios futuros tienen la necesidad de seguir centrándose en una mejor comprensión de la patogénesis molecular de estos tumores con la esperanza de identificar nuevos biomarcadores con mayor precisión que puedan ser utilizados en la práctica diaria.

La identificación de factores pronóstico en el cáncer de páncreas, fundamentalmente los que pueden ser determinados de forma preoperatoria, pueden dar información sobre el curso de la enfermedad y ayudar a elegir el tratamiento más apropiado para cada enfermo de forma individualizada, lo que resulta de gran importancia en este tipo de patologías, donde el pronóstico es malo a pesar de la intención de un tratamiento quirúrgico curativo, que por su parte está agravado con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad.

## Bibliografía

1. Hezel AF, Zhu AX. Systemic therapy for biliary tract cancers. *Oncologist*. 2008;13:415-423
2. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010 ;362 :1273- 1281.
3. García-Borobia FJ, Jorba-Martín R, Fabregat-Prous J. Adenocarcinoma de páncreas y del área periampular. En: Parrilla-Paricio P, LandaGarcía JI, eds. *Cirugía AEC. Manual de la Asociación Española de Cirujanos*. Madrid: Médica Panamericana; 2005. pp. 73-584
4. Friess H, Ko CK, Kleeff J. Pancreaticoduodenectomy, distal pancreatectomy, segmental pancreatectomy, total pancreatectomy and transduodenal resection of the papilla of Vater. En: Blumgart LH, ed. *Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas*. Philadelphia: Saunders; 2007. pp. 877-903.
5. Glimelius B, Hoffman K, Sjoden PO, et al. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol*. 1996; 7:593-600.
6. Yonemoto N, Furuse J, Okusaka T, et al. A multi-center retrospective analysis of survival benefits of chemotherapy for unresectable biliary tract cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2007; 37:843-851.
7. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Las cifras del cancer en España 2020*.
8. GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018.
9. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2016. *CA Cancer J Clin* 2016, 66: 7-30.
10. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366:1303-1314.
11. Siena, S., Drilon, A. E., Sai-Hong Ou, I., Farago, A. F., Patel, M., et al. Entrectinib (RXDX-101), an oral pan-Trk, ROS1, and ALK inhibitor in patients with advanced solid tumors harboring gene rearrangements. *European Journal of Cancer* 2015. 51, S724- S725.
12. Ardini E., Menichincheri M, Banfi P, Bosotti R., et al. Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. 2016 American Association for Cancer Research. Volume 15, Issue 4.
13. Mangeaud A., Elías Panigo DH. R-Medic. A simple and intuitive statistical analysis software. *Methodo* 2018 Mar;3(1): 18-22
14. 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(6):2403-2413.
15. Gourgou-Bourgade S, Bascoul-Molleivi C, Desseigne F, et al. Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):23-29

16. Peddi PF, Cho M, Wang J, Gao F, Wang-Gillam A. Nab-paclitaxel monotherapy in refractory pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol.* 2013;4(4):370-373
17. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2011;364(19):1817-1825.
18. Blanc J-F, Hubner R, Li C-P, et al. PD-018 subgroup analysis by prior non-liposomal irinotecan therapy in NAPOLI-1: a phase 3 study of nal-IRI±5-fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma previously treated with gemcitabine-based therapy [ESMO GI]. *Ann Oncol.* 2017;28(suppl) (3).
19. Pelzer U, Schwaner I, Stieler J, et al. Best supportive care (BSC) versus oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (OFF) plus BSC in patients for second-line advanced pancreatic cancer: a phase III-study from the German CONKO-study group. *Eur J Cancer.* 2011;47(11):1676-1681.
20. Glassman DC, Palmaira RL, Covington CM, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil for the treatment of advanced pancreatic cancer, a single institution experience. *BMC Cancer.* 2018;18(1):693.
21. Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, et al; NAPOLI-1 Study Group. 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):545-557.
22. Valle J, Wasan H, Palmer DH et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1273-1281.
23. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-9.
24. Motojima K, Tsunoda T, Kanematsu T, Nagata Y, Urano T, Shiku H. Distinguishing pancreatic carcinoma from other periampullary carcinomas by analysis of mutations in the Kirstenras oncogene. *Ann Surg* 1991; 214: 65762.
25. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Amheim N, Perucho M, et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant K-ras genes. *Cell*, 53 (1988), pp. 549-54
26. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Soleia E, et al. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer. Ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res*, 54 (1994), pp. 1556-60
27. Tada, M., Yokosuka, O., Omata, M., Ohto, M., & Isono, K. (1990). Analysis of ras gene mutations in biliary and pancreatic tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer*, 66(5), 930-935.
28. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53:549- 554.
29. Smit VTHBM, Boot AJM, Smits AMM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:7773-7782.
30. Ohashi K, Tsutsumi M, Nakajima Y, Nakano H, Konishi Y (1996) Ki-ras point mutations and proliferation activity in biliary tract carcinomas. *Br J Cancer* 74:930-935.
31. Boberg, K. M., Schrupf, E., Bergquist, A., Broomé, U., Pares, A., Remotti, H., ... Clausen, O. P. F. (2000). Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: K-ras mutations and Tp53 dysfunction are implicated in the neoplastic development. *Journal of Hepatology*, 32(3), 374-380.
32. Rashid A. Cellular and molecular biology of biliary tract cancer. *Surg. Oncol. Clin.N.A.*2002.Oct;11(4):995? 1009.
33. Hahn SA, Kem SE. Molecular genetics of exocrine pancreatic neoplasms. *Surg Clin North Am*, 75 (1995), pp. 857-69

34. Hruban RH, Iacrobuzio-Donahue C, Wilentz RE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J*, 7 (2001), pp. 251-62
35. Hilgers W, Rosty C, Hahn SA. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer *Hematol Oncol Clin North Am*, 16 (2002), pp. 17-35.
36. Barton CM, Staddon SL, Hughes CM. Abnormalities of p53 tumor suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 64 (1991), pp. 1076-85
37. Suto T, Sugai T, Nakamura S, Funato O, Nitta H, Sasaki R, Kanno S, Saito K (1998) Assessment of the expression of p53, MIB-1 (Ki-67 antigen), and argyrophilic nucleolar organizer regions in carcinoma of the extrahepatic bile duct. *Cancer* 82:86- 95.
38. Tomono H, Nimura Y, Aono K, Nakashima I, Iwamoto T, Nakashima N (1996) Point mutations of the c-Ki-ras gene in carcinoma and atypical epithelium associated with congenital biliary dilatation. *Am J Gastroenterol* 91:1211-1214
39. Weismüller, T. J., Wedemeyer, J., Kubicka, S., Strassburg, C. P., & Manns, M. P. (2008). The challenges in primary sclerosing cholangitis - Aetiopathogenesis, autoimmunity, management and malignancy. *Journal of Hepatology*, 48, S38-S57.
40. Kiba T, Tsuda H, Pairojkul C, Inoue S, Sugimura T, Hirohashi S. Mutations of the p53 tumor suppressor gene and the ras gene family in intrahepatic cholangiocellular carcinomas in Japan and Thailand. *Mol Carcinog* 1993; 8: 312-S.
41. Nadal T., O' Callaghan A., Caturla J., Mercadé T., Molecular characterization of advanced bile duct tumors and identification of potential predictive biomarkers of response to new therapeutic targets. University of Barcelona. 2019
42. Cheng Q, Luo X, Zhang B, Jiang X, Yi B, Wu M. et al. Carcinoma distal de los conductos biliares: factores pronósticos después de la cirugía radical. *Ann. Sug. Oncol.* 2007 Mar;14(3):1212-1219.
43. Ohashi K, Nakajima Y, Kanehiro H, Tsutsumi M, Taki J, Aomatsu Y, Yoshimura A, Ko S, Kin T, Yagura K, Konishi Y, Nakano H (1995) Ki-ras mutations and p53 protein expression in intrahepatic cholangiocarcinomas: relation to gross tumor morphology. *Gastroenterology* 109:1612-1617.
44. Ahrendt, S. A., Rashid, A., Chow, J. T., Eisenberger, C. F., Pitt, H. A., & Sidransky, D. (2000). p53 overexpression and K- ras gene mutations in primary sclerosing cholangitis-associated biliary tract cancer. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 7(4), 426-431.
45. Diamantis I, Karamitopoulou E, Perentes E, Zimmerman A (1995) p53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival. *Hepatology* 22:774-779
46. Teh M, Wee A, Raju GC (1994) An immunohistochemical study of p53 protein in gallbladder and extrahepatic bile duct/ampullary carcinoma. *Cancer* 74:1542-1545
47. Washington K, Gottfried MR (1996) Expression of p53 in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. *Liver* 16:99- 104.
48. Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, Katalinik A, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2003. May;52(5):706-712.
49. Simbolo M, Razzan T, Ruimenete L, et al. Multigene mtational profiling of colangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. *Oncotarget* 2014, 5: 2839-2852.
50. Sia D, Losie B, Moeni L, Cabellos L, et al. Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PPHLNI fusion and RAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* 2015; 6:6087-6098.
51. Borger DR, Tanabe KK, Fan KC, Lopez HU, et al. Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase IDN 1 and IDH 2 en cholangiocarcinoma identified through broad- based tumor genotyping. *Oncologist* 2012; 17:72-79.
52. Borger DR, Zhu AX. IDH mutations: new genetic signatures in

- cholangiocarcinoma and therapeutic implications. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012; 12:543-546.
53. Grassian AR, Pagliarini R, Chiang DY. Mutations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2014; 30:295-302.
54. Ang C. Role of the fibroblast growth factor receptor axis I cholangiocarcinoma. *J gastroenterol Hepatol* 2015; 30:1116-1122.
55. Hierro C, Rodon J, Tabernero J. Fibroblast growth factor (FGF) receptor/FGF inhibitors; novel targets and strategies for optimization of response of solid tumors. *Semin Oncol* 2015; 42:801-819.
56. Wu YM, Su F, et al. Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer Discov* 2013; 3:636-647.
57. Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2014; 59: 1427-1434.
58. Narong S, Leelawat K, Basic fibroblast growth factor receptor induces in sholangiocarcinoma cell migration voa activation Mek 1-2 pathway. *Oncol Lett* 2011; 2:821-825.
59. Moeini A, Sia, Bardesy M, Mazzaferro V. Molecular pathogenesis and targeted therapies of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2015; 22:291-300.
60. Jiao Y, Pawlik T, Anders RA, Selaru FM, et al, Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Gener* 2013; 45:1470-1473.
61. Lukas J, Parry D, Aagaard L y col. Inhibición del ciclo celular dependiente de proteínas de retinoblastoma por el supresor de tumores p16. *Naturaleza.* 1995; 375: 503-506.
62. Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP y col. Mayor riesgo de cáncer de páncreas en familias propensas al melanoma con mutaciones p16INK4. *New Engl J Med.* 1995; 333: 970-974.
63. Bartsch DK, Sina-Frey M, Lang S y col. Mutaciones de la línea germinal CDKN2A en el cáncer de páncreas familiar. *Ann Surg.* 2002; 236: 730-737
64. Lynch HT, Brand RE, Hogg D, et al. Variación fenotípica en ocho familias con tendencia a carcinoma de páncreas y melanoma de páncreas atípico familiar con mutación de la línea germinal CDKN2A extendida: el síndrome de carcinoma de páncreas con melanoma de páncreas atípico familiar. *Cáncer.* 2002; 94: 84-96
65. Schutte M, Hruban RH, Geradts J, et al. Abrogación de la vía supresora de tumores Rb / p16 en prácticamente todos los carcinomas de páncreas. *Cancer Res.* 1997; 57: 3126-3130
66. A.K. El-Naggar, S. Lai, G. Clayman, J.K. Lee, M.A. Luna, H. Goepfert, J.G. Batsakis. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 151 (1997), pp. 1767-1774.
67. Jiao L., Zhu J., Hassan MM., Evans DB., Abbruzzese J., et al. K-ras Mutation and p16 and Preproenkephalin Promoter Hypermethylation in Plasma DNA of Pancreatic Cancer Patients. *Pancreas*,2007; 34(1), 55-62.
68. P.S. Moore, B. Sipos, S. Orlandini, C. Sorio, F.X. Real, N.R. Lemoine, T. Gress, C. Bassi, G. Kloppel, H. Kalthoff, H. Ungefroren, M. Lohr, A. Scarpa. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.*, 439 (2001), pp. 798-802
69. E.E. Salo-Mullen, E.M. O'reilly, D.P. Kelsen, A.M. Ashraf, M.A. Lowery, K.H. Yu,D.L. Reidy, A.S. Epstein, A. Lincoln, A. Saldia, L.M. Jacobs, R. Rau-Murthy, L. Zhang, R.C. Kurtz, L. Saltz, K. Offit, M.E. Robson, Z.K. Stadler. Identification of germline genetic mutations in patients with pancreatic cancer. *Cancer* (2015)
70. Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in

- pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(14):4674-4679.
71. Hosoda W, Chianchiano P, Griffin JF, et al. Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *J Pathol.* 2017;242(1):16-23.
72. Yachida S, White CM, Naito Y, et al. Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6339-6347.
73. Wilentz RE, Su GH, Dai JL, et al. Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas: a new marker of DPC4 inactivation. *Am J Pathol.* 2000;156(1):37-43
74. Singh P, Srinivasan R, Wig JD. SMAD4 genetic alterations predict a worse prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas.*
75. Biankin AV, Morey AL, Lee C-S, et al. DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(23):4531-4542.
76. Gu, Y., Ji, Y., Jiang, H., & Qiu, G. Clinical Effect of Driver Mutations of KRAS, CDKN2A/P16, TP53, and SMAD4 in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2020; 24(12), 777-788.
77. Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Wilentz RE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J*, 7 (2001), pp. 251-62
78. Hilgers W, Rosty C, Hahn SA. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer *Hematol Oncol Clin North Am*, 16 (2002), pp. 17-35
79. Bardeesy N, De Pinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*, 2 (2002), pp. 897-909
80. Ghimenti C, Tannergard P, Wahlberg S. Microsatellite instability and mismatch repair gene inactivation in sporadic pancreatic and colon tumors. *Br J Cancer*, 80 (1999), pp. 11-21
81. Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, Fukushima H, Sasaki S, Perucho M, et al. Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability. *Cancer Res*, 61 (2001), pp. 3139-44.
82. Ruiz Tobar J., Martín-Pérez E., Fernández-Contreras M., Reguero-Callejas M., Gamallo-Amat C., Identificación de factores pronóstico en el cáncer de páncreas. *Cir Cir* 2011; 79:338-348
83. Morganti AG, Forni F, Macchia G, Valentini V, Smaniotto D, Trodella L, et al. Chemoradiation of unresectable pancreatic carcinoma: impact of pre-treatment haemoglobin levels on patterns of failure. *Strahlenther Onkol* 2003; 179:87-92.
84. Faloppi, L. et al. The correlation between LDH serum levels and clinical outcome in advanced biliary tract cancer patients treated with first line chemotherapy. *Sci. Rep.* 6, 24136

