

Implicaciones clínicas de la investigación básica

Análisis genético en el diagnóstico del cáncer de páncreas

En los últimos 15 años, ninguna área de investigación sobre el cáncer de páncreas exocrino (CPE) ha avanzado tanto como el análisis de sus bases genéticas. Desgraciadamente, este trabajo todavía no ha conducido a avances sustanciales en el manejo clínico de la enfermedad.

FRANCISCO X. REAL
Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular,
Institut Municipal d'Investigació Mèdica,
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.

Los genes *K-ras*, *p53*, *INK4A* y *Smad4* son importantes en el desarrollo del cáncer de páncreas.

En algunas lesiones preneoplásicas pueden detectarse alteraciones en *K-ras* e *INK4A*.

Es posible que la detección de mutaciones en *K-ras* pueda contribuir al diagnóstico precoz y/o diferencial del cáncer de páncreas, pero no hay evidencias suficientes que justifiquen su uso rutinario o en la toma de decisiones clínicas.

Son necesarios más estudios prospectivos para determinar la utilidad del análisis genético en el diagnóstico del cáncer de páncreas.

Mutaciones heredables en los genes *INK4A*, *BRCA2*, *p53* y del tripsinógeno catiónico pueden contribuir a la agregación familiar del cáncer de páncreas exocrino.

El origen genético del cáncer de páncreas

Los genes más frecuentemente alterados en el CPE “esporádico” son el oncogen *K-ras* y los genes supresores de tumores *p53*, *INK4A* y *Smad4*¹⁻¹².

El gen *K-ras* codifica para una GTPasa que participa en la transmisión de señales de factores de crecimiento y está mutado en un 75% de CPE^{1,3-8}. Cuando *ras* está unida a GTP es activa, mientras que unida a GDP es inactiva. Las proteínas *ras* mutadas están permanentemente activadas.

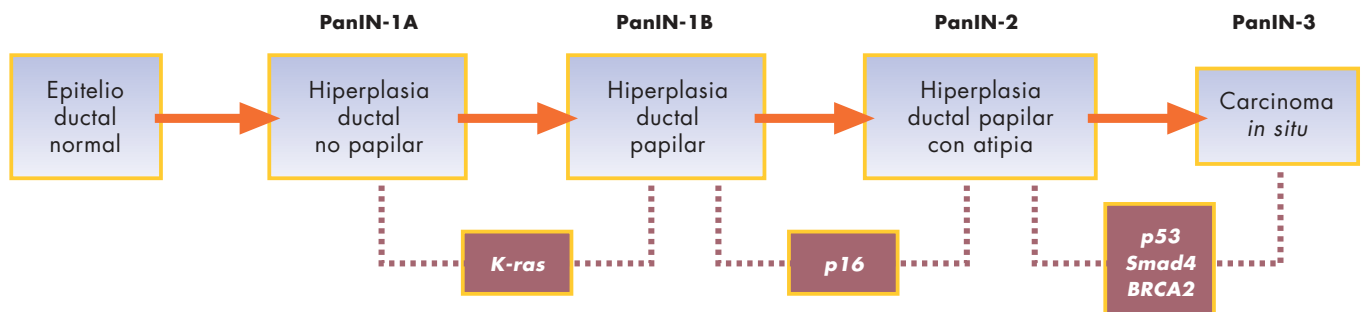
El gen *p53* codifica para un factor de transcripción que se activa en respuesta al daño del ADN. El gen *p53* induce la parada del ciclo celular, con lo cual la célula puede reparar el daño evitando que éste se transmita a la descendencia. De no ser así, *p53* induce apoptosis¹³. Aproximadamente el 50% de los tumores pancreáticos presentan mutaciones en *p53*, principalmente en la región de la proteína que se une al ADN^{1,7-9}.

El gen *INK4A* codifica dos proteínas, p16 y p14ARF, implicadas en el control del ciclo celular. p16 es un inhibidor de la entrada de las células en fase S y p14 activa *p53*¹⁴. La funcionalidad de p16 está abolida en prácticamente la totalidad de CPE, ya sea por pérdida de los dos alelos, pérdida de un alelo y mutación del restante o metilación del promotor^{1,10,12,15}.

El gen *Smad4* codifica para un regulador transcripcional que participa en la respuesta a los factores de la familia de TGF beta¹⁶. Este gen se halla inactivado en un 50% de CPE, ya sea por pérdida de los dos alelos o por pérdida de un alelo y mutación del restante^{1,10,12}.

El estudio de lesiones hiperproliferativas ductales ha demostrado la presencia de mutaciones en *K-ras* y, en algunos casos, en *INK4A*¹⁷. Por otra parte, la prevalencia de mutaciones en *K-ras* no está asociada al tamaño o estadio del tumor^{2,4,18}. En consecuencia, se piensa que estas mutaciones constituyen alteraciones genéticas precoces. Las alteraciones en los genes *p53* y *Smad4* parecen producirse más tarde en la progresión del tumor^{2,19,20} (fig. 1).

Figura 1. Modelo de progresión del CPE en relación con las alteraciones genéticas asociadas (adaptado de Hruban et al.). Se especifica la nueva nomenclatura de lesiones preneoplásicas (<http://www.path.jhu.edu/pancreas>)



Aplicabilidad del análisis genético al diagnóstico del CPE

Las mutaciones del gen *K-ras* han sido la alteración genética más frecuentemente estudiada en el diagnóstico del CPE ya que: 1) su prevalencia es muy alta; 2) la mayoría de ellas se localizan en el codón 12; 3) se pueden detectar en diversos tipos de muestras biológicas (i.e. tejido incluido en parafina, muestras de punción-aspiración, jugo pancreático, plasma y heces), y 4) los métodos para su detección son sencillos y sensibles (un alelo mutado en 1.000 alelos normales).

Inicialmente se propuso que las mutaciones en *K-ras* eran específicas de células neoplásicas; ahora sabemos que también están presentes en lesiones de hiperplasia ductal mucinosa con un bajo potencial de transformación neoplásica en el páncreas de pacientes con pancreatitis crónica y en algunos individuos normales^{17,20-23}.

Muy pocos estudios prospectivos han analizado la utilidad clínica de la detección de mutaciones en *K-ras*. Hay al menos dos escenarios en los que su estudio podría ser útil:

1. Diagnóstico diferencial de masas pancreáticas^{**}. Mora et al²⁴ analizaron la presencia de mutaciones en *K-ras* en muestras de punción-aspiración de masas pancreáticas. Mientras que la citología convencional presentó una sensibilidad del 75%, en combinación con el análisis molecular la sensibilidad alcanzó un 91% y la especificidad fue del 100%. El espectro de patología analizado en este estudio era relativamente reducido. Dos estudios han comparado la presencia de mutaciones en jugo pancreático/cepillados ductales y en tejido tumoral: Sturm et al²⁵ hallaron una correlación en el 88% de los casos, mientras que en Wilentz et al²⁶ la concordancia fue del 55%. En cuanto al tipo histológico/origen del tumor, la prevalencia de mutaciones en tumores indiferenciados del páncreas²⁷ y en carcinomas intraductales papilares mucinosos²⁸ es semejante a la del CPE. Por el contrario, los tumores acinares y endocrinos no presentan mutaciones en *K-ras*^{29,30}. Es poco probable que la detección de mutaciones en *K-ras* sea de utilidad en el diagnóstico diferencial del CPE con el ampuloma^{30,31} o los tumores de las vías biliares ya que en estos tumores se ha descrito una prevalencia de mutaciones del 20%³².

*La designación CPE se refiere, para simplificar, al adenocarcinoma ductal común.

**Se presentan solamente los resultados de estudios prospectivos.

Tabla 1. Principales síndromes de cáncer hereditario asociados a CPE

Síndrome	Gen	Otros tumores asociados
FAMMM	<i>INK4A</i>	Melanoma
Cáncer de mama familiar	<i>BRCA2</i>	Mama, próstata
Síndrome de Lynch tipo II	<i>MLH1, MSH2, PMS1, PMS2</i>	Colon, endometrio y otros
Síndrome de Li-Fraumeni	<i>p53, Chk2</i>	Múltiples localizaciones
Ataxia telangiectasia	<i>ATM</i>	Mama, leucemia/linfoma
Poliposis adenomatosa familiar	<i>APC</i>	Cáncer colorrectal y otros
Síndrome de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>	Tracto digestivo, genital femenino y otros
Pancreatitis hereditaria	Tripsinógeno catiónico	–
Fibrosis quística	<i>CFTR</i>	Tracto digestivo

2. Diagnóstico precoz de CPE. Berthelemy et al³³ describieron a 2 pacientes con patología benigna en los que se detectó una mutación en *K-ras* en muestras celulares de jugo/cepillado pancreático 18 y 40 meses antes, respectivamente, del diagnóstico de CPE. Queneau et al³⁴ detectaron una mutación en *K-ras* en 10/36 pacientes (28%) con pancreatitis crónica; durante el seguimiento, 2/10 pacientes con *K-ras* mutado frente a 0/26 pacientes con *K-ras* normal desarrollaron un CPE que se diagnosticó en un estadio avanzado, 7 y 17 meses después de la detección de la mutación. La prevalencia real de mutaciones en *K-ras* en pacientes con pancreatitis crónica no se conoce y probablemente depende del tipo de muestra y de la sensibilidad de la técnica^{23,33-38}.

Dos estrategias no invasivas que podrían ser útiles para el diagnóstico precoz del CPE son la detección de mutaciones en plasma/suero³⁹⁻⁴² o en heces⁴³. Ninguno de los estudios descritos hasta el momento permite hacer recomendaciones concretas en el contexto clínico diagnóstico o a nivel poblacional.

Alteraciones genéticas heredables

La historia familiar de cáncer de páncreas confiere un riesgo aproximado tres veces mayor de desarrollar el tumor⁴⁴⁻⁴⁶. Sólo una baja proporción de CPE es consecuencia de mutaciones heredables en genes de alta penetrancia. Los principales síndromes familiares de cáncer asociados a CPE son: 1) el síndrome familiar de melanoma maligno y lesiones pigmentadas atípicas (FAMMM), asociado a mutaciones en *INK4A*; 2) el cáncer de mama familiar asociado a mutaciones en el gen *BRCA*; 3) la pancreatitis crónica hereditaria asociada a mutaciones en el gen del tripsinógeno catiónico, y 4) el síndrome de Lynch II, asociado a mutaciones en genes de reparación del ADN (*MSH2* y *MLH1*)⁴⁴ (tabla 1). Existe poca información en nuestra población sobre la contribución de estas mutaciones al conjunto del CPE⁴⁸. El estudio de estos genes para el cribado y diagnóstico precoz de CPE no está desprovisto de dificultades clínicas y éticas^{49,50}. El papel de la identificación de mutaciones heredables en estos genes es todavía incierto.

Perspectivas

La diversidad metodológica en la selección de casos, recogida de la muestra y detección de mutaciones dificulta extraer conclusiones de los estudios realizados hasta ahora. La utilidad clínica de la detección de mutaciones en *K-ras* sólo podrá establecerse con certeza cuando: 1) se hayan realizado estudios clínicos diseñados específicamente para contestar esta pregunta en los que se haya incluido el espectro de patologías y pacientes en los que la prueba diagnóstica hubiera de ser utilizada en la práctica clínica, y 2) los resultados hayan sido replicados en estudios independientes. La utilidad del análisis genético de *p53*, *INK4A* y *Smad4* debe ser analizada con mayor detalle.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

- Kern SE. Molecular genetic alterations in ductal pancreatic adenocarcinomas. *Med Clin North Am* 2000; 84: 691-695.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2969-2972.
- 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.
- Caldas C, Kern SE. *K-ras* mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* 1995; 18: 1-6.
- Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ et al. *K-ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993; 143: 545-554.
- Porta M, Malats N, Jarrod M et al. Serum levels of organochlorine compounds and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Lancet* 1999; 354: 2125-2129.
- Blanck HM, Tolbert PE, Hoppin JA. Patterns of genetic alterations in pancreatic cancer: a pooled analysis. *Environ Mol Mutagen* 1999; 33: 111-122.
- Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M. Comparative analysis of mutations in the *p53* and *K-ras* genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1994; 58: 185-191.
- Scarpa A, Capelli P, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C et al. Pancreatic adenocarcinomas frequently show *p53* gene mutations. *Am J Pathol* 1993; 142: 1534-1543.
- Caldas C, Hahn SA, da Costa LT et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the *p16 (MTS1)* gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; 8: 27-32.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350-353.

Bibliografía recomendada

<http://www.path.jhu.edu/pancreas>

Una excelente dirección en la red para conocer algunos de los últimos avances en cáncer de páncreas y para familiarizarse con la nueva clasificación de lesiones preneoplásicas del páncreas.

American Gastroenterology Association. Position statement on epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal carcinoma. *Gastroenterology* 1999; 117: 1463-1484.

Una excelente puesta en contexto de los problemas actuales en cáncer de páncreas desde un punto de vista epidemiológico, clínico y molecular.

Malats N, Porta M, Fernández E, Real FX. Re: Detection of *c-K-ras* mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1353-1354.

Una nota de precaución acerca de la necesidad de efectuar estudios prospectivos para determinar la utilidad del análisis genético en el diagnóstico del CPE.

Mora J, Puig P, Boadas J et al. *K-ras* mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits. *Clin Chem* 1998; 44: 2243-2248.

Uno de los pocos estudios prospectivos que ha evaluado cómo la detección de mutaciones en *K-ras* puede aumentar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico citológico del CPE en muestras de punción-aspiración.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am* 2000; 84: 565-573.

Un estudio de colaboración que demuestra el importante aumento del riesgo a desarrollar CPE asociado a la pancreatitis crónica hereditaria, especialmente entre los fumadores.

12. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1731-1734.
13. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the *p53* network. *Molecular Cell* 2000; 408: 307-310.
14. Serrano M. The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 865-869.
15. Schutte M, Hruban RH, Gerads J et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 3126-3130.
16. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF beta signalling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309.
17. Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE. *p16* and *K-ras* gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 2140-2143.
18. Schaeffer BK, Glasner S, Kuhlmann E, Myles JL, Longnecker DS. Mutated *c-K-ras* in small pancreatic adenocarcinomas. *Pancreas* 1994; 9: 161-165.
19. 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 Res* 2000; 60: 2002-2006.
20. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 2000; 156: 1821-1825.
21. Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H et al. Frequent *c-K-ras* oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 1993; 53: 953-956.
22. DiGiuseppe JA, Hruban RH, Offerhaus GJ, Clement MJ, van den Berg FM, Cameron JL et al. Detection of *K-ras* mutations in mucinous pancreatic duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 144: 889-895.
23. Lohr M, Maisonneuve P, Lowenfels AB. *K-ras* mutations and benign pancreatic disease. *Int J Pancreatol* 2000; 27: 93-103.
24. Mora J, Puig P, Boadas J et al. *K-ras* gene mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits. *Clin Chem* 1998; 44: 2243-2248.
25. Sturm PD, Hruban RH, Ramsoek TB, Noorduynd LA, Tytgat GN, Gouma DJ et al. The potential diagnostic use of *K-ras* codon 12 and *p53* alterations in brush cytology from the pancreatic head region. *J Pathol* 1998; 186: 247-253.
26. Wilentz RE, Chung CH, Sturm PD, Musler A, Sohn TA, Offerhaus GJ et al. *K-ras* mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 96-103.
27. Hoorens A, Prenzel K, Lemoine NR, Kloppel G. Undifferentiated carcinoma of the pancreas: analysis of intermediate filament profile and *K-ras* mutations provides evidence of a ductal origin. *J Pathol* 1998; 185: 53-60.
28. Sessa F, Solcia E, Capella C et al. Intraductal papillary-mucinous tumours represent a distinct group of pancreatic neoplasms: an investigation of tumour cell differentiation and *K-ras*, *p53* and *cerbB-2* abnormalities in 26 patients. *Virchows Arch* 1994; 425: 357-367.
29. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E et al. *K-ras* and *p53* gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 1994; 54: 1556-1560.
30. Moore PS, Orlandini S, Zamboni G, Capelli P, Rigaud G, Falconi M et al. Pancreatic tumours: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrine tumorigenesis. *Br J Cancer* 2001; 84: 253-262.
31. Scarpa A, Zamboni G, Achille A, Capelli P, Bogina G, Iacono C et al. *ras*-family gene mutations in neoplasia of the ampulla of Vater. *Int J Cancer* 1994; 59: 39-42.
32. Malats N, Porta-Serra M, Piñol JL, Corominas JM, Rifà J, Real FX, for the PANK-ras I Project Investigators. *K-ras* mutations as a prognostic factor in extrahepatic bile system cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1679-1686.
33. Berthelemy P, Bouisson M, Escourrou J, Vaysse N, Rumeau JL, Pradayrol L. Identification of *K-ras* mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Int Med* 1995; 123: 188-191.
34. Queneau PE, Adessi GL, Thibault P, Cleau D, Heyd B, Manton G et al. Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a *K-ras* point mutation in the pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 700-704.
35. Gansauge S, Schmid RM, Muller J, Adler G, Mattfeldt T, Beger HG. Genetic alterations in chronic pancreatitis: evidence for early occurrence of *p53* but not *K-ras* mutations. *Br J Surg* 1998; 85: 337-340.
36. Orth M, Gansauge F, Gansauge S, Beger HG, Adler G, Schmid RM. *K-ras* mutations at codon 12 are rare events in chronic pancreatitis. *Digestion* 1998; 59: 120-124.
37. Furuya N, Kawa S, Akamatsu T, Furihata K. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and *K-ras* gene mutation detected in pancreatic juice. *Gastroenterology* 1997; 113: 593-598.
38. Wong T, Howes N, Greenhalf W, Lombard M, Smart H, Gilmore I et al. *K-ras* mutations in the absence of malignancy: implications for diagnostic and prognostic use. *Digestion* 2000; 61: 308 (Abstract).
39. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 67-71.
40. Yamada T, Nakamori S, Ohzato H et al. Detection of *K-ras* gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1527-1532.
41. Mulcahy HE, Lyautey J, Lederer C, Qi C, Anker P, Alstead EM et al. A prospective study of *K-ras* mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 271-275.
42. Castells A, Puig P, Mora J et al. *K-ras* mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 1999; 17: 578-584.
43. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of *K-ras* mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 3568-3573.
44. Hruban RH, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, Falatko F et al. Familial pancreatic cancer. *Ann Oncol* 1999; 10: 69-73.
45. Fernandez E, La Vecchia C, D'Avanzo B, Negri E, Franceschi S. Family history and the risk of liver, gallbladder, and pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 209-212.
46. Silverman DT, Schiffman M, Everhart J et al. Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1999; 80: 1830-1837.
47. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC. Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *Med Clin North Am* 2000; 84: 565-573.
48. Real FX, Sinilnikova O, Malats N, Porta M, Guarner L, Carrato A et al. en nombre de los investigadores del proyecto PANKRASII. Mutaciones en el gen *BRCA2* en pacientes con cáncer de páncreas exocrí. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24: 105 (Abstract).
49. Brentnall TA, Bronner MP, Byrd DR, Haggitt RC, Kimme MB. Early diagnosis and treatment of pancreatic dysplasia in patients with a family history of pancreatic cancer. *Ann Int Med* 1999; 131: 247-255.
50. Lynch HT, Brand RE, Lynch F, Fusaro RM, Smyrk TC, Goggins M et al. Genetic counseling and testing for germline *p16* mutations in two pancreatic cancer-prone families. *Gastroenterology* 2000; 119: 1756-1760.