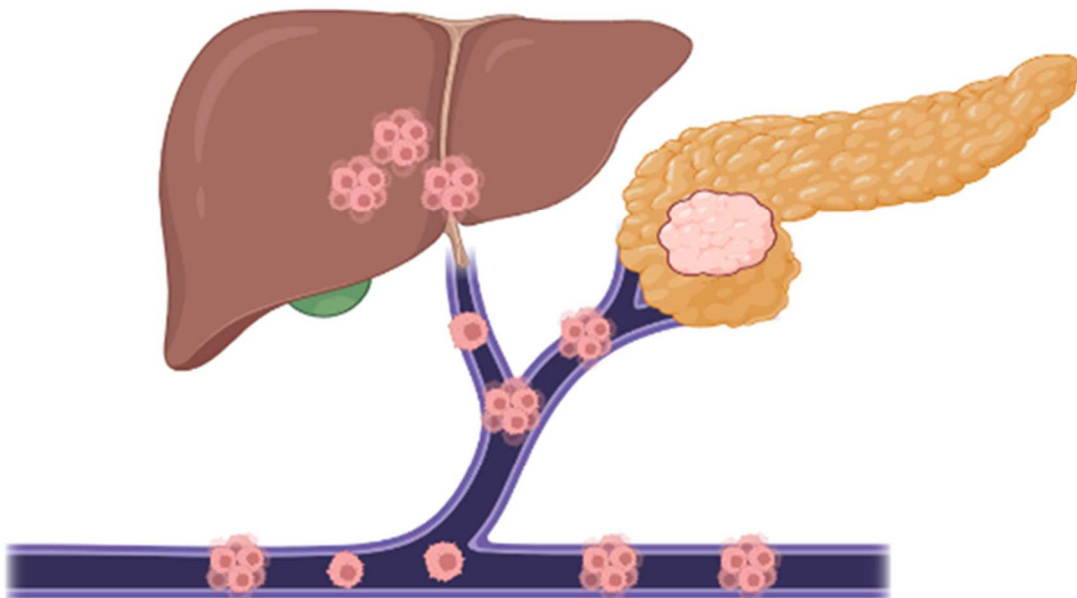




UNIVERSIDAD DE SEVILLA
PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA E INVESTIGACIÓN
CLÍNICA

TESIS DOCTORAL

DETERMINACIÓN DE CTCs COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE PÁNCREAS



SHEILA PEREIRA ARENAS



DETERMINACIÓN DE CTCs COMO MARCADOR PRONÓSTICO EN EL CÁNCER DE PÁNCREAS

Tesis Doctoral presentada por

SHEILA PEREIRA ARENAS

Para optar al Grado de Doctor

por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2023

Tutor: PROF. D. FRANCISCO JAVIER PADILLO RUÍZ

Directores: PROF. D. FRANCISCO JAVIER PADILLO RUÍZ

PROF. D. JORDI MUNTANÉ RELAT

Orgullosa de ser su hija,
no hay mejor forma de agradecerles el esfuerzo y los sacrificios
que han hecho para que hoy pueda estar donde estoy.

A mis padres

Y a ti, Lela (DEP), porque desde donde estás te siento cada día a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento al Prof. D. Francisco Javier Padillo Ruíz. El día que me sugirió la idea de realizar la tesis me pareció una locura, por mis circunstancias personales en ese momento, pero consideraba que era un paso importante para mi desarrollo profesional. Durante todo el proceso me ha animado, apoyado, orientado y ha tenido una paciencia infinita en cuanto a los tiempos. Por todo ello, GRACIAS.

A los Profs. D. Fernando de la Portilla y D. Jordi Muntané Relat, por darme la oportunidad de llevar a cabo mi sueño de trabajar en un Laboratorio de Investigación. Inicié mis estudios en la Facultad de Biología por interés en la ecología pero pronto descubrí que lo que realmente me motivaba e ilusionaba era el laboratorio y, gracias a ellos, pude hacerlo realidad.

A toda la Unidad HBP del Hospital Universitario Virgen del Rocío por su colaboración en la extracción de las muestras en el quirófano y por, en los últimos años que estamos trabajando codo a codo, su paciencia, cariño y hacerme sentir como una más del equipo.

A la Unidad de Coloproctología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, por los años que hemos trabajado juntos.

Quisiera hacer mención a una persona que ha sido importante para mí durante mis años de formación, Gracia, profesora del Grado Superior de Técnico de Laboratorio en Diagnóstico Clínico y, con los años amiga, quien confió en mí desde el principio y sabía que lo conseguiría.

A todas aquellas personas que, aún sin nombrarlas, las tengo en mi mente: amigos que se convierten en parte de mi familia, compañeros con los que a pesar de las larguísimas jornadas en el laboratorio siempre hay tiempo para las risas...A todos ellos gracias por estar siempre ahí.

A mi familia, padres y hermano, por su apoyo incondicional y por ser los pilares fundamentales de mi vida.

Por último, quiero darle las gracias de todo corazón a la persona con la que comparto mi día a día desde hace más de media vida, a Raúl, mi marido. Una persona que me ha apoyado desde que estamos juntos, que

ha aguantado mis llantos, agobios, frustraciones...El conseguir lo que tengo ahora, a nivel profesional, no ha sido un camino de rosas y él ha estado siempre a mi lado, dándome ánimos y confiando en mí más que yo misma. Mil gracias por todo eso, por tu amor infinito y, sobre todo, por haberme regalado el papel más importante de mi vida, el ser madre.

Y, por supuesto gracias a mis hijas, Martina y Gabriela, por su comprensión y cariño estos últimos meses y por ser el motor de mi vida. OS AMO.

“LO ÚNICO IMPOSIBLE, ES AQUELLO QUE NO INTENTAS”

Anónimo

ABREVIATURAS

ADCP:	Adenocarcinoma ductal de páncreas
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNct:	ADN tumoral circulante
ADNmt:	ADN mitocondrial
AFM:	Microscopía de fuerza atómica
AFP:	Alfa-fetoproteína
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
APC:	Células presentadoras de antígeno
ARNm:	ARN mensajero
AT:	Adenina/Timina
B72.3 (TAG-72):	Glicoproteína asociada a tumores-72
BAAF:	Biopsia por aspiración con aguja fina
BB:	Binding buffer
BL:	Biopsia líquida
BRCA1 y 2:	Cáncer de mama 1 y 2
CA 15-3:	Antígeno carbohidrato 15-3
CA 19-9:	Antígeno carbohidrato 19-9
CA 125:	Antígeno carbohidrato 125
CA 242:	Antígeno carbohidrato 242
CAM-1:	Molécula 1 de adhesión celular
CCP:	Células de cáncer de páncreas
CDKN2A (p16/INK4A):	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A
CEA:	Antígeno carcinoembrionario

CEC:	Células epiteliales circulantes
Células NK:	Células natural killer
cfDNA:	ADN libre circulante
CK:	Citoqueratina
CK-FITC:	Anti-CK-isotiocianato de fluoresceína
CO ₂ :	Dióxido de carbono
COX-2:	Ciclooxigenasa 2
CP:	Cáncer de páncreas
CPRM:	Colangiopancreatografía por resonancia magnética
CRD:	Cuaderno de recogida de datos
CTC:	Célula tumoral circulante
CTD:	Células tumorales diseminadas
CTL:	Linfocitos T citotóxicos
CTRC:	Quimotripsina C
CV:	Coeficiente de variación
CVC:	Catéter venoso central
Cy3:	Anti-CD45-Indocarbocianina
ddPCR:	Droplet digital PCR
DE:	Desviación estándar
DEP-FFF:	Fraccionamiento dielectroforético de flujo de campo
DMEM:	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DPC:	Duodenopancreatectomía cefálica
EEUU:	Estados Unidos
EGFR (HER1):	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMR:	Enfermedad mínima residual
EMT:	Transición epitelio-mesénquima
EpCAM:	Molécula de adhesión de células epiteliales

FAMMM:	Síndrome del melanoma de nevo múltiple atípico familiar
FasL:	Ligando Fas
FBS:	Suero bovino fetal
HBOC:	Síndrome de cáncer hereditario de mama y ovario
HCC:	Hepatocarcinoma
HER2:	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HR:	Hazard ratio
IBiS:	Instituto de Biomedicina de Sevilla
IC:	Intervalo de confianza
IGF:	Factor de crecimiento insulínico
IL-8:	Interleuquina-8
KRAS:	Oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
LS:	Síndrome de Lynch
m:	Media
MDSCs:	Células mieloides supresoras
MEC:	Matriz extracelular
MET:	Transición mesénquimo-epitelial
mFOLFIRINOX:	Quimioterapia adyuvante con pauta modificada de 5-fluorouracilo leucovorina- irinotecán-oxalipaltino
MHC I:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
miARN:	microARN
MLH1:	Homólogo MutL 1
MUC:	Mucina
NF-κB:	Factor nuclear kappa B
NMPI:	Neoplasia mucinosa papilar intraductal

p53 (TP53):	Gen supresor de tumores en el cromosoma 17 humano (17p13) (“guardián del genoma”)
PAF:	Poliposis adenomatosa familiar
PanIN:	Neoplasia intraepitelial pancreática
PBS:	Buffer fosfato salino
PBS-CMF:	Buffer fosfato salino sin calcio ni magnesio
PC:	Pancreatitis crónica
PD:	Pancreaticoduodenectomía
PD-L1:	Ligando 1 de muerte programada
PET:	Tomografía por emisión de positrones
PH:	Pancreatitis hereditaria
PMBC:	Célula mononuclear de sangre periférica
PRSS1 y 2:	Serín proteasa 1 y 2
PSA:	Antígeno prostático específico
RM:	Resonancia magnética
RMN:	Resonancia magnética nuclear
S100A4:	S100 Calcium binding protein A4
SG:	Supervivencia global
sICAM-1:	Molécula 1 de adhesión intercelular soluble
SLe:	Antígeno sializado de Lewis o CA 19-9
SLE:	Supervivencia libre de enfermedad
SMAD4 (DPC4):	Gen supresor de tumores en el cromosoma 18 humano (18q21.2)
SPINK1:	Inhibidor de la serina peptidasa Kazal tipo 1
SPJ:	Síndrome de Peutz-Jeghers
STK11:	Serina/treonina quinasa 11
T2DM:	Diabetes mellitus tipo 2
TC:	Tomografía computarizada

TGF- β :	Factor de crecimiento transformante beta
TNF:	Factor de necrosis tumoral
Treg:	Células T reguladoras
UE:	Unión Europea
USE:	Dispositivo de ultrasonido endoscópico
VEs:	Vesículas extracelulares
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VHB:	Virus de la hepatitis B
VP:	Vena porta
Y col.:	Y colaboradores

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El cáncer de páncreas es un tumor maligno intratable en el que la mayoría de los pacientes no muestran síntomas evidentes hasta que la enfermedad alcanza un estadio avanzado, lo que dificulta su detección precoz y hace que el tratamiento sea tardío. Esta situación dificulta la tendencia hacia la mejoría en la curva de supervivencia de estos pacientes. En caso del cáncer de páncreas metastásico la supervivencia es aún menor. En la actualidad no existen marcadores pronósticos y predictivos que indiquen la presencia de invasión vascular, neural o linfática, lo que dificulta el manejo clínico de los pacientes y, por tanto, su posibilidad de curación. Entre los biomarcadores que podrían evaluarse antes de la operación, las CTCs, como parte de la familia de la BL, podrían ser uno de los marcadores clínicos propuestos.

OBJETIVOS:

Generales:

- Evaluar los niveles de CTCs y clusters en los pacientes con cáncer de páncreas y su posible correlación con el pronóstico de la enfermedad.

Específicos:

1. Validar una metodología de cuantificación y caracterización de CTCs y *clusters* mediante el algoritmo de la transformado de Hough.
2. Determinar la vía óptima de determinación de CTCs y *clusters* comparando muestras de sangre portal versus central.
3. Valorar la posible correlación de CTCs y *clusters* con los parámetros que definen las características del tumor.
4. Valorar las CTCs y *clusters* como factor pronóstico para la supervivencia global de los enfermos.
5. Valorar la presencia de CTCs y *clusters* como factor pronóstico de recurrencia local o sistémica.

MÉTODO: Se han evaluado CTCs y *clusters* en 35 pacientes con adenocarcinoma pancreático temprano a partir de 7 ml de muestras de sangre venosa portal (VP) y central (CVC) extraídas en el momento de la cirugía. Para el aislamiento de CTCs y *clusters* se ha utilizado el sistema Isoflux™, que se basa en un proceso microfluídico de selección positiva inmunomagnética. Las células aisladas se detectaron mediante microscopía de fluorescencia tras tinción inmunocitoquímica (CK+/CD45-/Hoechst33342+) y se cuantificaron utilizando el método del algoritmo de la transformada de Hough.

RESULTADOS: Los pacientes con menos de 185 CTCs ($p=0,018$) y con menos de 15 *clusters* ($p=0,040$) en VP mostraron una mayor SG, así como los que no presentaron invasión vascular, linfática y tumor con grado de diferenciación G3. El análisis multivariante mostró que tanto un número de CTCs<185 ($HR=4,464$; $p=0,016$) como la ausencia de invasión vascular ($HR=3,663$; $p=0,013$) fueron predictores independientes de mejor supervivencia a largo plazo. En cuanto a la supervivencia libre de progresión local, tanto el análisis univariante como el multivariante, determinaron que tan solo la invasión linfática se mostró como factor predictor independiente de recurrencia local. El análisis univariante para supervivencia libre de progresión sistémica demostró que solo la invasión vascular determinaba una menor supervivencia libre de enfermedad para las metástasis.

CONCLUSIONES:

1. El método de la transformada de Hough ha resultado ser adecuado para la cuantificación y caracterización de CTCs, *clusters* y CTCs dentro de *clusters*, tras su aislamiento mediante el sistema Isoflux™.
2. Existe una buena correlación entre los resultados obtenidos en ambas vías de acceso, portal y central, y no hay diferencias significativas entre ellas en cuanto a las características del tumor consideradas, tales como grado de diferenciación, tamaño y niveles preoperatorios de CA 19-9.
3. Sin embargo, los resultados obtenidos en la vía portal mostraron una mayor correlación entre los niveles de CTCs y *clusters* con la supervivencia global, no observándose en la vía central.
4. En relación a la supervivencia global, la presencia de más de 185 CTCs/ml y la invasión vascular fueron

factores predictores independientes de mal pronóstico a largo plazo.

5. En cuanto a los factores pronósticos de supervivencia libre de progresión local, tan solo la invasión linfática se mostró como factor predictor independiente de recurrencia local.
6. Finalmente, con respecto a los factores pronósticos de supervivencia libre de progresión sistémica, sólo la invasión vascular se asoció con una menor supervivencia libre de enfermedad para las metástasis, no pudiéndose contrastar en el análisis multivariante.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1. ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER DE PÁNCREAS	2
1.1. INCIDENCIA	3
1.2. HISTOPATOLOGÍA Y PATRONES DE DISEMINACIÓN	5
1.2.1. Histología	5
1.2.2. Patrones de diseminación	8
1.3. FACTORES DE RIESGO	10
1.3.1. Edad	10
1.3.2. Género	10
1.3.3. Raza y etnia	11
1.3.4. Grupo sanguíneo	11
1.3.5. Antecedentes familiares y susceptibilidad genética	12
1.3.6. Diabetes	13
1.3.7. Pancreatitis crónica	14
1.3.8. Obesidad	14
1.3.9. Factores nutricionales	15
1.3.10. Tabaquismo	15
1.3.11. Alcohol	16
1.3.12. Infección	16
1.3.13. Exposición a oligoelementos	17
1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	18
1.4.1. Ictericia y síntomas relacionados	18
1.4.2. Dolor de abdomen o de espalda	19
1.4.3. Pérdida de peso y falta de apetito	19

1.4.4. Náuseas y vómitos	19
1.4.5. Agrandamiento de la vesícula biliar o del hígado	19
1.4.6. Coágulos sanguíneos	20
1.4.7. Diabetes	20
1.5. DIAGNÓSTICO	21
1.5.1. Exploración física	21
1.5.2. Análisis de sangre	21
1.5.3. Marcadores tumorales	22
1.5.4. Tomografía computarizada (TC)	23
1.5.5. Tomografía por emisión de positrones (PET)	23
1.5.6. Resonancia magnética (RM)	24
1.5.7. Ecografía	24
1.5.8. Biopsia de tejido	25
1.5.9. Biopsia líquida	25
1.6. CLASIFICACIÓN	26
1.6.1. Según grado de diferenciación	26
1.6.2. Según el sistema TMN	26
1.7. TRATAMIENTO	28
1.7.1. Tratamiento paliativo	28
1.7.2. Tratamiento con intención curativa	28
1.8. PRONÓSTICO Y RESULTADOS A DISTANCIA	31
1.8.1. Mortalidad	31
1.8.2. Metástasis como factor determinante del pronóstico	32
1.8.2.1. Inicio de la metástasis	33
1.8.2.2. Nicho metastásico y macrometástasis	36
1.8.2.3. Nicho premetastásico	37
1.8.2.4. Exosomas y metástasis tumoral	38

2. BIOPSIA LÍQUIDA	40
2.1. BIOPSIA LÍQUIDA	40
2.1.1. ADN libre circulante	41
2.1.2. Exosomas	42
2.1.3. Células tumorales circulantes	42
2.2. CTCs Y <i>CLUSTERS</i>	43
2.2.1. Caracterización de CTCs	44
2.2.2. Las células contribuyen a la supervivencia de las CTCs	45
2.2.3. <i>Clusters</i>	46
2.3. BIOPSIA LÍQUIDA Y CÁNCER DE PÁNCREAS	49
2.3.1. Aplicaciones clínicas de la biopsia líquida en el cáncer de páncreas	49
2.3.2. Respuesta a los tratamientos y evaluación del pronóstico	50
2.3.3. Metástasis y recurrencia	51
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN	52
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS	54
1. HIPÓTESIS NULA	55
2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA	55
CAPÍTULO IV. OBJETIVOS	56
1. GENERALES	57
2. ESPECÍFICOS	57
CAPÍTULO V. MATERIAL Y MÉTODO	58
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	59
2. PACIENTES	61
2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	61
2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	61
3. METODOLOGÍA	63

3.1. DETERMINACIONES REALIZADAS	63
3.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CTCs Y <i>CLUSTERS</i>	65
3.2.1. Cultivo celular	65
3.2.2. Preparación de muestras para la recuperación, precisión, sensibilidad y linealidad de la detección de células de cáncer de páncreas	65
3.2.3. Aislamiento y detección de CTCs y <i>clusters</i>	66
3.2.3.1. Biopsia líquida	66
3.2.3.2. Protocolo de enriquecimiento	67
3.2.3.2.1. Preparación de reactivos	67
3.2.3.2.2. Enriquecimiento de la fracción de células mononucleares	69
3.2.3.2.3. Conjugación de las beads con la muestra	71
3.2.3.2.4. Aislamiento con Isoflux™ System	72
3.2.3.2.5. Recuperación de las células aisladas	73
3.2.3.3. Protocolo de enumeración	73
3.2.3.3.1. Preparación de reactivos	73
3.2.3.3.2. Tinción y visualización de las células	74
3.2.4. Método de enumeración de CTCs y <i>clusters</i> . Algoritmo de Hough	75
3.2.4.1. Pre-procesamiento de imágenes	76
3.2.4.2. Segmentación de imágenes	76
3.2.4.3. Post-procesamiento de imágenes	77
4. VARIABLES	79
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	80
CAPÍTULO VI. RESULTADOS	81
1. CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE ESTUDIO	82
2. VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CTCs MEDIANTE EL ALGORITMO DE HOUGH	83
2.1. EVALUACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS	83

2.2. EVALUACIÓN DE LA DETECCIÓN DE <i>CLUSTERS</i>	85
2.3. EVALUACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE CTCs Y <i>CLUSTERS</i>	86
3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DE CTCs Y <i>CLUSTERS</i>	
EN FUNCIÓN DE LA VÍA DE ACCESO	86
3.1. CORRELACIÓN ENTRE CTCs Y <i>CLUSTERS</i> EN SANGRE PORTAL Y CENTRAL	86
3.2. CORRELACIÓN ENTRE CTCs Y <i>CLUSTERS</i> EN SANGRE PORTAL Y CENTRAL	
SEGÚN GRADO DE DIFERENCIACIÓN	87
3.3. CORRELACIÓN ENTRE CTCs Y <i>CLUSTERS</i> EN SANGRE PORTAL Y CENTRAL	
SEGÚN TAMAÑO Y NIVELES DE CA 19-9	89
3.4. CORRELACIÓN ENTRE CTCs Y <i>CLUSTERS</i> EN SANGRE PORTAL Y CENTRAL	
SEGÚN INVASIÓN MICROSCÓPICA	90
4. ANÁLISIS DE CTCs Y <i>CLUSTERS</i> EN RELACIÓN A LA SUPERVIVENCIA GLOBAL	91
4.1. RESULTADOS GLOBALES DE SUPERVIVENCIA	91
4.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL EN FUNCIÓN DE LOS NIVELES DE CTCs Y <i>CLUSTERS</i> .	
ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE VÍA PORTAL Y CENTRAL	92
4.3. FACTORES PRONÓSTICOS PARA LA SUPERVIVENCIA GLOBAL. ANÁLISIS	
UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE	93
4.3.1. Análisis univariante	93
4.3.2. Análisis multivariante	94
5. FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	96
5.1. FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN LOCAL	96
5.1.1. Análisis univariante	96
5.1.2. Análisis multivariante	98
5.2. FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SISTÉMICA	98
5.2.1. Análisis univariante	98
5.2.2. Análisis multivariante	100

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN	101
1. LIMITACIONES Y DISCUSIÓN DEL MÉTODO	104
1.1. LIMITACIONES	104
1.2. AISLAMIENTO DE CTCs	104
1.3. MÉTODO DEL ALGORITMO DE LA TRANSFORMADA DE HOUGH	106
2. VÍA PORTAL vs. VÍA CENTRAL	109
3. FACTORES PRONÓSTICO PARA LA SUPERVIVENCIA GLOBAL	114
4. FACTORES PRONÓSTICOS PARA LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	114
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES	116
CAPITULO IX. BIBLIOGRAFÍA	118
ANEXOS	145
ANEXO I. DICTAMEN DEL CEI DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS VIRGEN MACARENA- VIRGEN DEL ROCÍO	146
ANEXO II. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	148
ANEXO III. INFORME ANATOMÍA PATOLÓGICA	156
ANEXO IV. CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS	157
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	175
ANEXO V. PATENTE	176
ANEXO VI. ARTÍCULO CANCERS	178
ANEXO VII. ARTÍCULO INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES	193

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER DE PÁNCREAS

El páncreas es una glándula situada en la parte superior del abdomen, detrás del estómago y delante de la columna vertebral. Se divide en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza se sitúa en la curvatura del duodeno (primera porción de intestino delgado). El resto de la glándula se prolonga hacia la izquierda con el cuerpo y finaliza en la cola que se encuentra próxima al bazo. Es importante su proximidad a la vena porta (VP) y a la arteria y vena mesentérica superior. En el interior del páncreas existe un conducto pancreático principal o de Wirsung y puede existir un conducto accesorio secundario, o de Santorini. Es por ahí, donde discurren las secreciones pancreáticas que se unen al colédoco y desembocan en el duodeno por la ampolla de Vater. La irrigación de la glándula corresponde al territorio del tronco celíaco y de la mesentérica superior.

Un páncreas sano normal tiene células acinares que secretan enzimas digestivas, células centroacinares y ductales que son las encargadas de la secreción hidroelectrolítica, islotes endocrinos que secretan hormonas y células estrelladas, en estado latente, responsables de la fibrogénesis pancreática.

El cáncer de páncreas (CP) se origina a partir de mutaciones anormales en el ADN del páncreas que hacen que las células pancreáticas crezcan y se dividan sin control, generando tumores [1]. El CP hace referencia a los tumores malignos del aparato digestivo que se originan principalmente del epitelio ductal pancreático y de las células acinares.

1.1. INCIDENCIA

El CP es un tumor maligno intratable que según las estimaciones de GLOBOCAN 2020, es el duodécimo más común en cuanto a malignidad y el séptimo en mortalidad, que causó 466.003 muertes en 2020 (4,7% de todas las muertes causadas por cáncer) [2] (Fig. 1).

España tiene una tasa de mortalidad superior a muchos otros países, ocupando el cuarto lugar en mortalidad, siendo más alta en los hombres (7,1 por cada 100.000,) que en las mujeres (4,3 por cada 100.000) [2] (Fig. 2).

Varias estimaciones, basadas en el análisis de casos durante la última década, estiman un aumento en su diagnóstico del 0,8% por año. Esto supone que, si no hay progresos significativos, para el 2030 será la segunda causa de muerte por cáncer en EEUU y la UE, después del cáncer de pulmón [3].

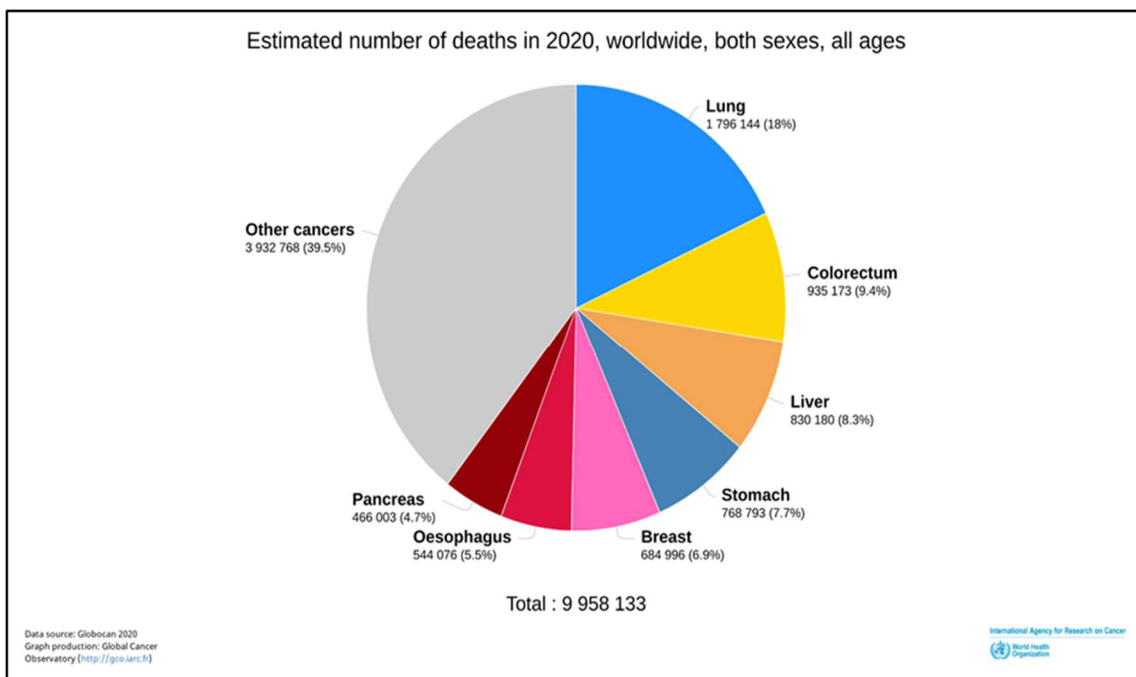


Fig. 1. Número estimado de muertes en 2020, a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades [2].

La incidencia aumenta con la edad tanto en hombres como en mujeres [4]. La mediana de edad en el primer diagnóstico es de 70 años para los hombres y de 76 años para las mujeres. Los factores causales son ambientales y genéticos [5]. La mayoría de los pacientes no muestran síntomas evidentes hasta que la enfermedad alcanza un estadio avanzado, lo cual dificulta la detección precoz [6]. Tras la progresión del tumor,

después de que se ha diseminado a otros órganos, se manifiesta como un inicio gradual de síntomas no específicos [7].

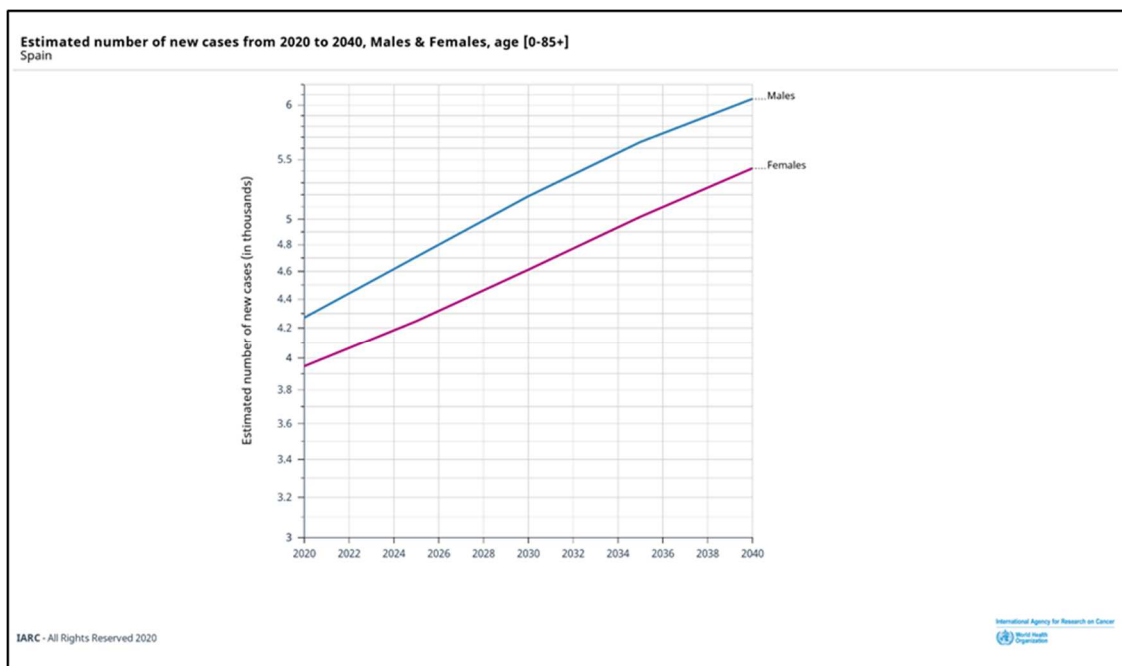


Fig. 2. Número estimado de nuevos casos entre 2020 y 2040 en España [2].

A pesar del avance en el conocimiento de los posibles factores de riesgo que causan el CP y las herramientas disponibles para el diagnóstico precoz, la incidencia mundial se duplicará para el año 2040 [2] (Fig. 3).

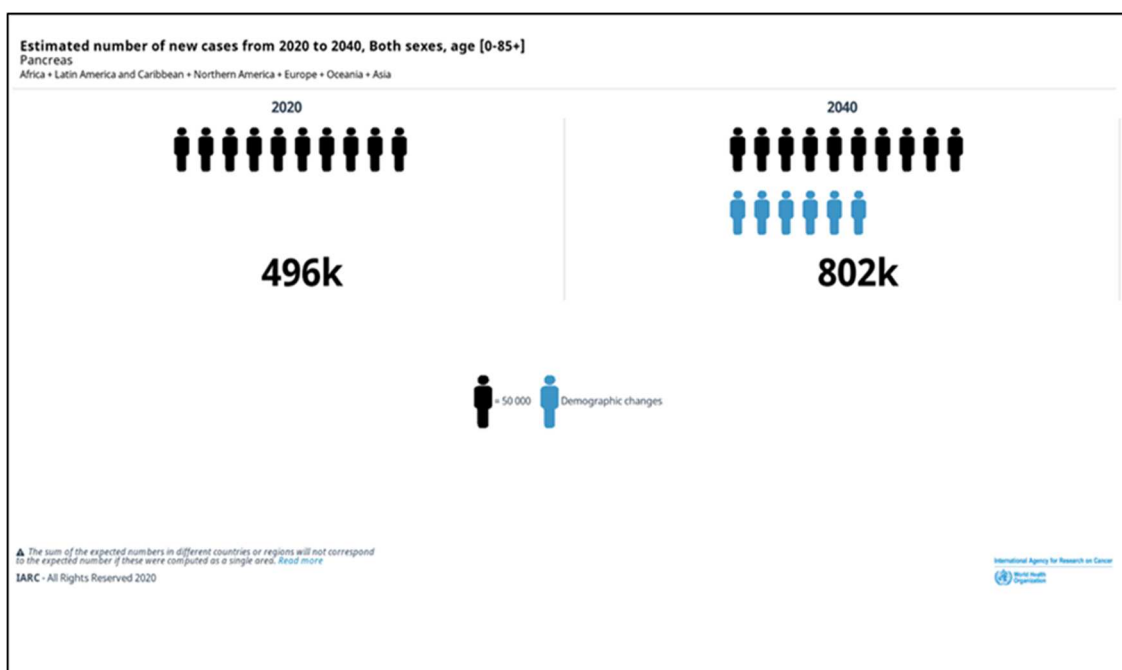


Fig. 3. Número estimado de nuevos casos entre 2020 y 2040 [2].

1.2. HISTOPATOLOGÍA Y PATRONES DE DISEMINACIÓN

1.2.1. Histología

Las lesiones tumorales pancreáticas se pueden dividir tomando como referencia múltiples características [8-11]. Los tumores quísticos son raros (3% de los tumores pancreáticos y 10% de los malignos). Los adquiridos que pueden ser benignos como los cistoadenomas (seroso y mucinoso), de malignidad intermedia (cistoadenoma mucinoso papilar intraductal) y malignos como el cistoadenocarcinoma que es muy infrecuente. Los tumores sólidos benignos del páncreas son muy infrecuentes y en este grupo se clasifican el tumor seudopapilar sólido y el adenoma acinar. En el conjunto de los tumores sólidos malignos de páncreas debemos destacar dos: el carcinoma acinar representa del 1 a 2% de los tumores pancreáticos exocrinos y el adenocarcinoma ductal (Fig.4).

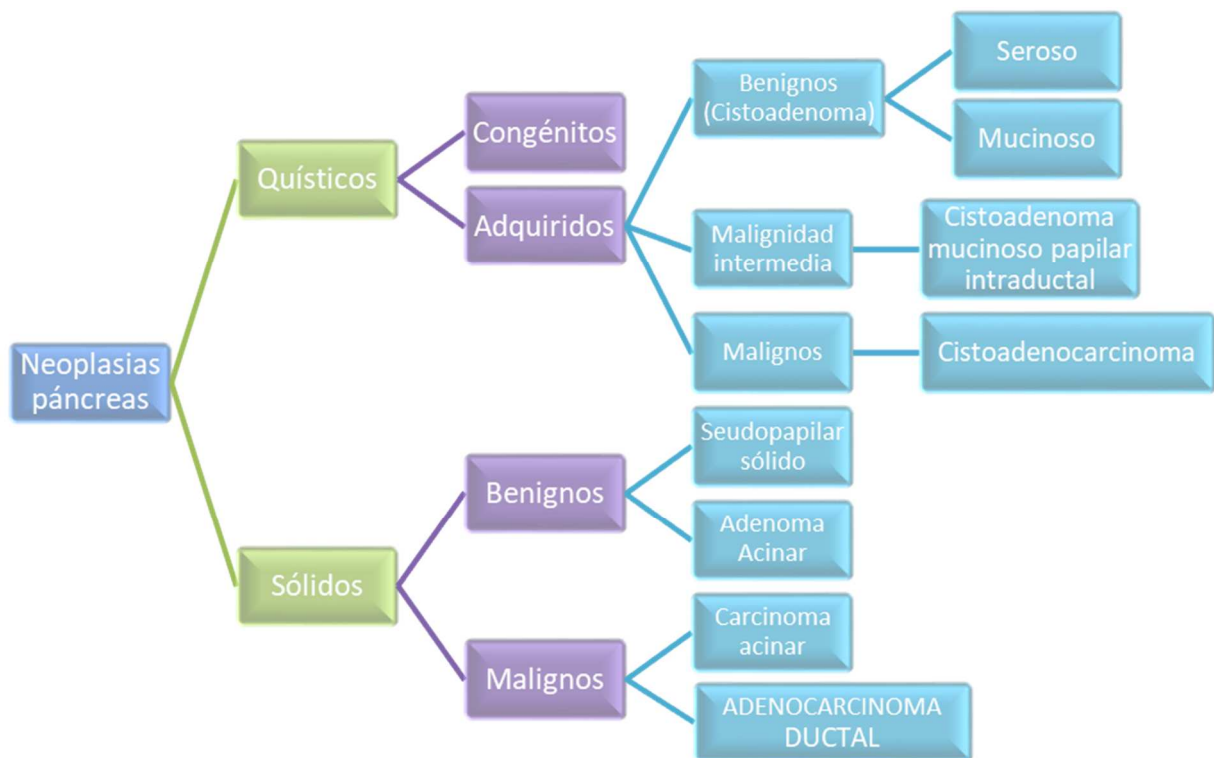


Fig. 4. Clasificación histopatológica de las neoplasias de páncreas.

El **Adenocarcinoma ductal de páncreas (ADCP)** fue descrito en 1760 por Morgagni en sus estudios histológicos. Los criterios diagnósticos que estableció han sido utilizados durante más de 200 años [12]. Es el tumor sólido maligno de páncreas más frecuente. Este tipo de tumor y sus variantes suponen el 80-90% de

las neoplasias pancreáticas y una proporción mayor de las neoplasias malignas. El 70% se desarrolla en la cabeza del páncreas. El ADCP comienza en las células que recubren los conductos que transportan las enzimas digestivas fuera del páncreas [13] y es uno de los cánceres más agresivos asociado con un mal pronóstico y una alta mortalidad, teniendo el menor índice de resecabilidad y menor supervivencia a largo plazo.

A nivel macroscópico suelen ser grandes (tamaño medio de 3 cm), duros, irregulares, arenosos de color gris amarillo y mal delimitados. Una elevada proporción de casos se diagnostican cuando tienen metástasis a distancia (ganglionares y/o hematológicas). Los que aparecen en cuerpo y cola alcanzan diámetros mayores porque son asintomáticos durante más tiempo que los localizados en la cabeza pancreática.

En la microscopía óptica existen dos características fundamentales: la intensa reacción desmoplásica (compuesta de fibras de colágeno, fibroblastos y células inflamatorias) y células neoplásicas muy bien diferenciadas que no se corresponden con la alta letalidad de este tumor.

En el estudio inmunohistoquímico expresan citoqueratinas (CK7, CK8, CK18, CK19 y, de forma variable, CK20), mucina (MUC1, MUC4 y MUC5A), marcadores oncológicos (CEA, B72.3, CA 125 y CA 19-9) y marcadores específicos de CP (mesotelina, S100A4, etc.).

La historia natural de los ADCP comienza con un epitelio ductal sano que sufre una displasia para transformarse en una Neoplasia Intraepitelial Pancreática (PanIN). A su vez, ésta se desarrolla en tres etapas: displasia leve (PanIN-1), moderada (PanIN-2) y severa (PanIN-3). Histológicamente son pequeñas (<0.5cm), papilares y crecen dentro de los ductos pancreáticos. En cada una de estas etapas se activan una serie de oncogenes y factores de crecimiento. Solo un 1% de los PanIN desarrollarán un cáncer invasivo [14] (Fig. 5).

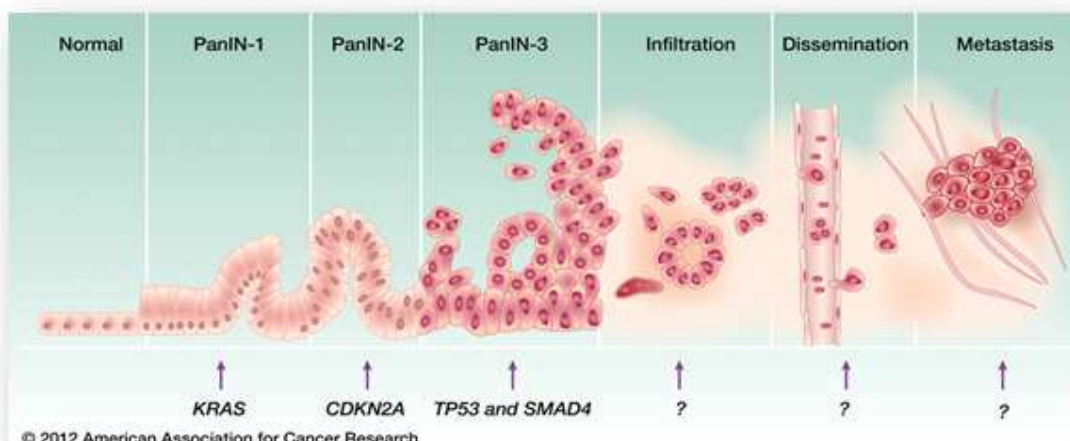


Fig. 5. Modelo para el desarrollo del CP [Imagen tomada de la American Association for Cancer Research].

En el proceso patogénico se desarrolla una fibrosis y reacción desmoplásica intensa del estroma. La "desmoplasia tumoral" se forma por un incremento en el tejido conectivo que infiltra y envuelve el tumor. Las células estrelladas pancreáticas que participan en la desmoplasia tumoral se caracterizan por expresar alfa-SMA (actina de músculo liso) y por la síntesis de procolágeno alfa-1T que son los principales componentes de la matriz extracelular (MEC) que constituyen la reacción desmoplásica.

Las células estromales de estos tumores evidencian un aspecto morfológico dendrítico, expresan citofilamentos y una capacidad de síntesis de sustancias de la MEC idénticos a los hallados en casos de pancreatitis crónica (PC) inducida por alcohol, lo cual sugiere unos mecanismos similares subyacentes al desarrollo de la fibrosis en la PC y de la desmoplasia en el adenocarcinoma pancreático. Existe además evidencia creciente de la relación que existe entre las células estrelladas pancreáticas y las células tumorales; por mecanismos conocidos parcialmente las células estrelladas pueden estimular el crecimiento tumoral, además pueden promover la invasión tumoral y posiblemente la angiogénesis [14]. Esta zona de PC que rodea el tumor se debe teóricamente a la obstrucción de esos conductos adyacentes por las células tumorales [8-11].

Otra lesión precursora del adenocarcinoma de páncreas es la Neoplasia Mucinoso Papilar Intraductal (NMPI). Estas lesiones abarcan un amplio espectro de neoplasias quísticas con distinto potencial maligno y una transformación celular que va desde la displasia de bajo grado (adenoma) hasta el adenocarcinoma invasivo. Se caracterizan por presentar una proliferación papilar intraductal de células columnares que producen una cantidad abundante de mucina, provocando la dilatación del conducto pancreático principal (conducto de Wirsung) y/o de sus ramas. Esta diferencia tiene importancia clínica ya que la afectación del conducto principal se ha identificado como un factor de riesgo para la transformación maligna. Un conducto de Wirsung mayor de 9 mm se considera un factor de alto riesgo, mientras que una dilatación comprendida entre 5-9 mm se considera un factor preocupante de malignidad. Existe una tercera clasificación denominada "NMPI de tipo mixto", que afecta tanto al conducto principal como a las ramas secundarias, que no debería ser considerada independiente puesto que presenta el mismo comportamiento clinicopatológico que los que afectan al conducto principal [15].

Se distinguen hasta cuatro subtipos en función de sus características histológicas y la expresión de

mucina: gástrico, intestinal, pancreatobiliar y oncocítico. La mayoría de los que afectan al conducto principal pertenecen al subtipo intestinal, que tiende a progresar hacia carcinoma coloide, biológicamente menos agresivo y, por tanto, tiene mejor pronóstico que el adenocarcinoma pancreático convencional. Los que afectan a las ramas secundarias se asocian frecuentemente con el subtipo gástrico, que es mayormente benigno. Sin embargo, si esta línea celular degenera, lo hace en carcinoma tubular, que implica mayor riesgo de invasión vascular, perineural y metástasis ganglionar, con un peor pronóstico similar al ADCP. Los subtipos pancreatobiliar y oncocítico son menos comunes y contrastan mucho en su comportamiento biológico. Los del subtipo pancreatobiliar se asocian con la tasa más alta de invasión tumoral (68%) y transformación en carcinoma tubular (82%), mientras que los oncocíticos muestran una biología inmutable [16].

1.2.2. Patrones de diseminación

- **Invasión local:** Es la primera fase de la diseminación del tumor. Depende de la localización del mismo, ya que se van a ver afectadas las estructuras anatómicas adyacentes. Los que afectan a la cabeza del páncreas pueden infiltrar el antro gástrico y el duodeno produciendo obstrucciones altas del tránsito o hematemesis. Los de cuerpo y cola de páncreas afectan al cuerpo gástrico, bazo, primer asa yeyunal, hígado y peritoneo, principalmente.
- **Diseminación linfática:** Es la que realiza el tumor a través de los conductos y ganglios linfáticos locorregionales que drenan la zona periampular donde se localiza. Esta diseminación afecta al pronóstico. Si las lesiones son cercanas al páncreas (primera estación, adenopatías del hilio hepático e incluso del tronco celíaco) el tumor se considerará resecable, pero con una afectación negativa en la supervivencia del paciente. Si las adenopatías afectas se encuentran lejos del tumor, como los ganglios inter-aorto-cavos se considerará igual que si tuviese metástasis hepáticas. Sin embargo, la afectación linfática no contraindica “per se” la resección del tumor.
- **Diseminación perineural:** Este tipo de diseminación es característica del adenocarcinoma de páncreas.

Los estudios muestran una incidencia del 51-100% y se encuentra presente en los estadios incipientes y es posible que se disemine a través de la longitud del nervio. En algunos casos es causa de dolor intratable y de recidiva tumoral por lo que se considera un factor pronóstico independiente.

- **Diseminación hemática:** Consiste en la liberación de células tumorales al torrente sanguíneo y su crecimiento a distancia del tumor primario. La glicosilación alterada es una de las características del ADCP. La expresión del antígeno sializado de Lewis (SLe) se encuentra incrementada en la superficie de glicoproteínas o glico-esfingolípidos de las células del ADCP y la expresión de estos ligandos presenta una correlación negativa con la supervivencia del paciente. Estos antígenos glucídicos, ligandos de interacción específicos para la molécula de adhesión E-Selectina, se encuentran involucrados en la extravasación de las células tumorales [17]. Los órganos que más frecuentemente se afectan por este tipo de lesiones son:
 - **Hígado:** Sobre todo en tumores de cuerpo y cola.
 - **Plexo celíaco:** Son un conjunto de nervios que se encuentran a nivel del tronco celíaco. Son causa de dolor de espalda severo en estos pacientes.
 - **VP y vasos mesentéricos superiores:** La arteria y la vena mesentérica superior cruzan en contacto con el páncreas a nivel del proceso uncinado. Una vez que la vena mesentérica superior y la vena esplénica confluyen para formar el tronco común portal, éste discurre dorsal a la cabeza pancreática. Una obstrucción de estas estructuras vasculares produciría defectos de perfusión o retorno venoso intestinal y/o hepático.
 - **Ligamento de Treitz:** Es el ligamento que fija la primera asa de yeyuno. La afectación de este ligamento puede producir una obstrucción intestinal.

1.3. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo de CP se clasifican en no modificables (edad, género, raza y etnia, grupo sanguíneo, antecedentes familiares y susceptibilidad genética, diabetes, PC) y modificables (obesidad, factores nutricionales, tabaquismo, alcohol, infección, exposición a oligoelementos).

1.3.1. Edad

El CP ocurre principalmente en personas de edad avanzada, y es extremadamente raro que los jóvenes menores de 30 años desarrollen la enfermedad. En los EEUU, a la mayoría de los pacientes se les diagnostica CP en una edad avanzada, con una mediana de edad de 70 años en el momento del diagnóstico, y sólo el 10,6% de los diagnósticos se realizan en pacientes antes de los 55 años. La mortalidad también es mayor en el mismo grupo de edad, con una mediana de edad al morir de 72 años [18]. El CP puede estar asociado con cambios morfológicos y patológicos del páncreas relacionados con la edad, como la disfunción de los telómeros [19].

1.3.2. Género

El CP es un 30% más común en hombres que en mujeres. La tasa de incidencia general ajustada por edad para el CP es de 13,9/100.000 para los hombres y de 10,9/100.000 para las mujeres. Existen marcadas diferencias en las tasas de incidencia entre hombres y mujeres en países desarrollados y subdesarrollados. En los países desarrollados se observan tasas de incidencia de 8,5/100.000 para hombres y 5,6/100.000 para mujeres, mientras que en los países menos desarrollados o en desarrollo es de 3,3/100.000 para hombres y 2,4/100.000 para mujeres [20]. Varios estudios han evaluado factores de riesgo hormonales específicos de género para un papel causal en la susceptibilidad al CP. Sin embargo, los estudios no han demostrado el efecto protector de los estrógenos contra el CP [21].

1.3.3. Raza y etnia

Se han reportado grandes diferencias en la incidencia de CP entre razas. En los EEUU, la incidencia en los afroamericanos es más alta que en los caucásicos, mientras que los asiáticos americanos y los habitantes de las islas del Pacífico tienen la incidencia más baja. Los afroamericanos también tienen más probabilidades de recibir un diagnóstico de enfermedad avanzada y menos probabilidades de someterse a una cirugía por CP [20]. Se cree que, el hecho de que la incidencia sea más alta entre los afroamericanos, se debe a las diferencias en los factores de riesgo modificables, como la dieta, el alcohol, el tabaquismo y la deficiencia de vitamina D. Sin embargo, los estudios basados en la población demuestran que el aumento de la incidencia de CP no puede explicarse totalmente por los factores de riesgo conocidos y presuntos nombrados anteriormente, lo que indica que al aumento del riesgo pueden contribuir otros factores [22]. Los resultados de varias investigaciones muestran que puede haber diferencias genéticas y moleculares relacionadas con la raza y la etnia, que pueden influir tanto en la incidencia como en el comportamiento biológico del CP. Estas diferencias explicarían también la diferencia en las tasas de supervivencia después del tratamiento entre grupos raciales. En concreto, los pacientes asiáticos parecen tener una mejor tasa de supervivencia que los pacientes no asiáticos [20].

1.3.4. Grupo sanguíneo

Las personas con el grupo sanguíneo A, AB o B tienen un mayor riesgo de desarrollar CP que las personas con el grupo O. Cada vez hay más evidencias de que el grupo sanguíneo ABO también puede estar asociado con la carcinogénesis o la progresión del CP [23]. El gen que codifica el antígeno ABO puede estar relacionado con varios componentes del plasma, como la molécula 1 de adhesión intercelular soluble (sICAM-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Estas proteínas son moléculas de adhesión necesarias para el reclutamiento de células inmunitarias y, por lo tanto, median en la inflamación sistémica. Estos estudios sugieren que dicho gen juega un papel directo en la tumorigénesis y la malignidad, y está involucrado en el control inmunológico de las células tumorales, la adhesión celular, la apoptosis tumoral y la angiogénesis [24].

1.3.5. Antecedentes familiares y susceptibilidad genética

El CP es una enfermedad fundamentalmente genética causada por mutaciones genéticas tanto hereditarias como adquiridas. Más del 80% del CP se desarrolla debido a mutaciones que ocurren esporádicamente. Una pequeña proporción de los casos de CP se deben a mutaciones hereditarias de la línea germinal.

- Mutaciones genéticas heredadas (línea germinal)

Aproximadamente del 5 al 10% de los pacientes con CP tienen antecedentes familiares de CP. El CP familiar se define como tener al menos dos familiares de primer grado con CP. El riesgo de CP aumenta exponencialmente con el número de familiares de primer grado afectados, oscilando desde tres veces el riesgo cuando están afectados dos familiares de primer grado hasta un riesgo 57 veces mayor con tres familiares de primer grado afectados [25].

El CP hereditario puede presentarse en el contexto de varios síndromes hereditarios:

1. Síndrome de cáncer hereditario de mama y ovario (HBOC): asociados a mutaciones en BRCA1, BRCA2 y PALB2. Los pacientes con mutaciones en BRCA1 y PALB2 presentan un riesgo entre 3,5-10 veces mayor de desarrollar CP [18, 20].
2. Pancreatitis hereditaria (PH): se caracteriza por PC y pancreatitis aguda recurrente, cuyos genes causantes incluyen PRSS1, SPINK1, PRSS2 y quimotripsina C (CTRC). Presentan un riesgo acumulativo entre 10-54% de desarrollar CP [18, 20].
3. Síndrome de Peutz- Jeguers (SPJ): con una mutación en STK11, se caracteriza por la presencia de pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal o mucosas. Asociado a un riesgo 100 veces mayor de desarrollar CP y un riesgo acumulativo de hasta un 36% [20, 26].
4. Síndrome del melanoma de nevo múltiple atípico familiar (FAMMM): se debe a una mutación en el gen CDKN2A (p16) y se ha relacionado con un riesgo 12-20 veces mayor de desarrollar CP [18, 20].
5. Síndrome de Lynch (SL): principalmente en pacientes portadores de mutaciones en MLH1, muestran un aumento de 8,6 veces de desarrollar CP y un riesgo acumulativo de 3,7% a los 70

años [27].

6. Poliposis adenomatosa familiar (PAF): mutaciones en la línea germinal en APC, con un riesgo acumulado de CP del 1,7% a los 80 años de edad [18].

- Mutaciones genéticas adquiridas (mutaciones somáticas)

Además de las mutaciones genéticas heredadas, las mutaciones adquiridas (somáticas) en genes específicos también contribuyen al desarrollo del CP. Cuatro genes se ven principalmente afectados en el cáncer esporádico: KRAS (95% de los tumores), CDKN2A (p16) (90%), p53 (75%) y SMAD4 (55%) [28, 29]. El desarrollo y crecimiento del cáncer es un proceso que incluye varios pasos entre los que se encuentran la iniciación, la progresión, la invasión y, por último, el establecimiento de la enfermedad metastásica. De forma parecida, el CP se origina en el epitelio ductal y progresa desde lesiones premalignas hasta un cáncer completamente invasivo. La progresión de epitelio mínimamente displásico (PanIN1a y B) a displasia más severa (PanIN2 y 3) y, finalmente, a carcinoma invasivo es paralela a la acumulación sucesiva de mutaciones que incluyen la activación del oncogén KRAS2, la inactivación del gen supresor de tumor CDKN2A/INK4A y, finalmente, la inactivación de los genes supresores de tumores TP53 y SMAD4/DPC4 [30].

1.3.6. Diabetes

La epidemiología moderna confirma un riesgo significativamente mayor de desarrollar CP en personas diabéticas [31]. En la diabetes tipo 1, el riesgo de CP aumenta entre 5 y 10 veces en pacientes con una enfermedad de más de 10 años. Las personas con la enfermedad diagnosticada de más de 20 años tienen un mayor riesgo de CP [32]. En comparación con los pacientes sin diabetes, los pacientes con la enfermedad recién diagnosticada tienen un riesgo de desarrollar CP casi 7 veces mayor [33]. La hiperglucemia o la diabetes aparecen hasta en el 80% de los pacientes, y ambas pueden detectarse en la etapa presintomática. Por el contrario, los pacientes de edad avanzada con diabetes de reciente aparición tienen un riesgo 8 veces mayor de desarrollar CP que la población general, sugiriendo una "causalidad dual" entre la diabetes y el CP. Esto significa que tanto la diabetes mellitus tipo 2 de larga duración (T2DM) es un factor de riesgo de desarrollar CP como el CP se supone que es una causa de diabetes en muchos casos [34, 35]. Hay estudios que sugieren

que la hiperglucemia, la exposición a altas concentraciones de insulina y la resistencia a insulina están asociadas con un mayor riesgo de CP [36, 37].

1.3.7. Pancreatitis crónica

La pancreatitis crónica (PC) es una enfermedad inflamatoria progresiva del páncreas con destrucción de células acinares y fibrosis patológica significativa. Las principales etiologías de la PC son el abuso de alcohol, hereditaria e idiopática, con una fuerte predisposición genética. La PC puede considerarse un factor de riesgo para el CP. La asociación entre pancreatitis y CP es especialmente fuerte en pacientes con la rara pancreatitis hereditaria autosómica dominante. El riesgo para estos pacientes es aproximadamente 70 veces mayor que el esperado para la población general, con un riesgo de por vida de aproximadamente del 40 al 55% [38]. Ahora se ha demostrado que la PC aumenta el riesgo de CP a través de una cascada de procesos inflamatorios complementados por mutaciones somáticas y hereditarias. Es probable que un riesgo mucho mayor de cáncer en algunas formas de PC (p. ej., hereditaria) se deba a la duración prolongada de la inflamación y probablemente se vea potenciado por la exposición a toxinas ambientales (como fumar cigarrillos). La PC idiopática determinada genéticamente tiene un mayor riesgo de CP, mientras que el riesgo de PC relacionada con el alcohol puede ser mucho menor [39]. Sin embargo, dado que la incidencia y la prevalencia de la PC son relativamente bajas y la frecuencia acumulada general de CP en estos pacientes a los 20 años es solo del 5%, el riesgo atribuible a la población de CP debido a la PC es bastante bajo en comparación con otros factores más prevalentes [40].

1.3.8. Obesidad

Para las células cancerosas que proliferan rápidamente, la oxidación de lípidos y la biosíntesis son fundamentales para su supervivencia. En comparación con el tejido no tumoral, la grasa puede mejorar la viabilidad de las células cancerosas [41]. Los datos epidemiológicos indican que la obesidad es un factor de riesgo importante para el CP. Existen múltiples mecanismos patogénicos propuestos para el aumento del

riesgo de CP con el aumento de peso. La obesidad puede estar asociada con la inactividad física, una dieta y un estilo de vida poco saludable y factores genéticos no descubiertos todavía, pueden desempeñar un papel en el aumento del riesgo. A nivel celular, los adipocitos pueden liberar mediadores pro-carcinogénicos potenciales como adipocinas, IGF y VEGF o provocar inflamación crónica, que podría desempeñar un papel en la patogénesis del cáncer [42].

1.3.9. Factores nutricionales

Puesto que el páncreas participa estrechamente en el metabolismo de los nutrientes, existe un gran interés en el posible papel etiológico de la dieta y factores relacionados para el CP en hasta el 30-50% de los casos [20]. Un alto consumo de carne (especialmente a la parrilla), colesterol, alimentos fritos y otros alimentos que contienen nitrosaminas, aumenta el riesgo de CP [43], así como un alto consumo de refrescos azucarados [44-46].

1.3.10. Tabaquismo

Fumar está también estrechamente relacionado con la aparición y el desarrollo del CP. El tabaquismo es el factor de riesgo ambiental más importante para el CP, con un riesgo atribuible a la población del 25% al 35% [47]. El páncreas está expuesto indirectamente a los productos del tabaco, bien porque los carcinógenos relacionados con el tabaco llegan al páncreas a través del torrente sanguíneo o bien a través de la exposición del páncreas a los carcinógenos del tabaco contenidos en el jugo duodenal o la bilis. Esta segunda vía podría ocurrir en la cabeza del páncreas, que es donde se producen la mayoría de los cánceres pancreáticos [20]. El tabaquismo pasivo y la exposición al humo también se han asociado con el CP en una relación de respuesta a la dosis. En un estudio de cohorte prospectivo europeo, se asocia la exposición al humo de tabaco ambiental en la infancia con el doble de riesgo de CP en pacientes sin antecedentes de tabaquismo [48]. Se ha demostrado que fumar aumenta significativamente el riesgo de CP en pacientes con otros factores de riesgo. En una cohorte de pacientes con PH, los fumadores tienen el doble de probabilidades de desarrollar CP y a

una edad más temprana que los no fumadores, sugiriendo una interacción gen-ambiental [49].

1.3.11. Alcohol

Durante mucho tiempo se ha sospechado que el alcohol es un factor de riesgo para el CP debido a su papel en la etiología de la PC. Es ampliamente aceptado que el metabolismo del etanol altera el estado redox intracelular, pudiendo tener un papel importante en el mecanismo subyacente a la PC inducida por el alcohol y al CP. El metabolismo del etanol a través de la oxidación por la alcohol deshidrogenasa, o a través del sistema de oxidación microsomal, da lugar a metabolitos tóxicos como acetaldehído y especies reactivas de oxígeno. Estos metabolitos pueden afectar las funciones pancreáticas tanto exocrinas como endocrinas, activar las células estrelladas pancreáticas para inducir fibrosis y provocar la liberación de mediadores proinflamatorios (p. ej., citoquinas, NF-κB, COX-2). Como consecuencia, pueden ocurrir daños en los orgánulos celulares y alteración genética, lo que puede contribuir a la carcinogénesis pancreática [20]. Además, el consumo de alcohol se correlaciona negativamente con el tiempo de supervivencia después del diagnóstico de CP. Los resultados de los estudios de cohortes mostraron que cada aumento de 10 g/día en la ingesta de alcohol aumenta el riesgo de muerte por CP en un 9% [50].

1.3.12. Infección

Dos estudios han mostrado una relación entre el virus de la hepatitis B (VHB) y la infección por el virus de la hepatitis C y el CP, siendo la relación más fuerte para la infección por el VHB [51, 52]. También se ha informado una asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el CP. Un metanálisis de 7 estudios encontró un aumento del riesgo de CP del 65% en personas infectadas con esta bacteria [53]. Las enfermedades virales, como las paperas, y las infecciones bacterianas, como la enteritis por *Salmonella* y *Salmonella typhi*, pueden afectar el páncreas, por lo que pueden estar asociadas con un mayor riesgo de CP.

1.3.13. Exposición a oligoelementos

Los oligoelementos, como el hierro y el cadmio, están asociados con un mayor riesgo de CP. Un estudio prospectivo mostró una asociación entre el hierro hemo y un mayor riesgo de CP en mujeres fumadoras. Las concentraciones de cadmio en la orina también se asociaron significativamente con un mayor riesgo de CP. Además, la exposición a oligoelementos del medio ambiente, como el arsénico y el plomo, también puede aumentar el riesgo de CP [20].

1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

A menudo, el CP en etapas tempranas no causa ningún signo o síntoma. Con frecuencia, ha crecido mucho o ya se ha diseminado fuera del páncreas para cuando causa síntomas. Las manifestaciones clínicas del CP incluyen dispepsia, pérdida de peso, náuseas, ictericia, vómitos, heces flotantes, dolor y, en ocasiones, pancreatitis [54].

Aproximadamente el 70% del CP surge en la cabeza del páncreas y a menudo se presenta con obstrucción biliar que provoca orina oscura, ictericia, pérdida de apetito, fatiga, pérdida de peso e insuficiencia pancreática exocrina. En cambio, las personas con CP en el cuerpo y cola presentan síntomas más inespecíficos, como dolor abdominal, dolor de espalda y síntomas relacionados con la caquexia (pérdida de apetito, pérdida de peso, fatiga). Por tanto, los signos y síntomas están relacionados con la ubicación de la glándula. La aparición o el empeoramiento de la diabetes preexistente puede ser un signo de ADCP [55]. En raras ocasiones, la pancreatitis aguda puede ser una manifestación primaria de ADCP y ocurre en aproximadamente el 3% de los pacientes con ADCP recién diagnosticado [56].

1.4.1. Ictericia y síntomas relacionados

La ictericia es la coloración amarillenta de la piel y las mucosas y es causada por la acumulación de bilirrubina, contenida en la bilis. La bilis, liberada por el hígado, pasa por el colédoco hacia los intestinos donde ayuda a desintegrar las grasas y sale del cuerpo en las heces. Cuando el colédoco se obstruye, la bilis no puede llegar hasta los intestinos y la bilirrubina se acumula en el cuerpo. Cuando el CP comienza en la cabeza del páncreas, al estar cerca del colédoco, lo presiona y causa ictericia aun siendo bastante pequeño, por lo que a veces se pueden detectar en etapa inicial [57, 58].

Otros signos de ictericia son:

- Orina oscura: a menudo es el primer signo de ictericia. Al aumentar los niveles de bilirrubina en la sangre, la orina se torna de un color marrón.
- Heces pálidas o grasosas: la bilirrubina ayuda a dar a las heces su color marrón. Si se bloquea el

conducto biliar, las heces pueden tener tonos grises o un color más claro. Además, si la bilis y las enzimas pancreáticas no pueden llegar a los intestinos para ayudar a desintegrar las grasas, las heces pueden convertirse en grasosas y flotar en el inodoro.

- Prurito: cuando la bilirrubina se acumula en la piel, ésta se pone amarilla y empieza a picar.

1.4.2. Dolor de abdomen o de espalda

Es común en el CP. Si éste se origina en el cuerpo o la cola del páncreas, puede crecer y comenzar a presionar otros órganos cercanos causando dolor. Además, puede extenderse a los nervios cercanos al páncreas provocando dolor de espalda [57, 58].

1.4.3. Pérdida de peso y falta de apetito

Es muy común que las personas que padecen CP pierdan peso porque tienen poco o ningún apetito [57, 58].

1.4.4. Náuseas y vómitos

Si el cáncer presiona el extremo distal del estómago, puede bloquearlo parcialmente y dificultar el paso de los alimentos, lo cual causa náuseas, vómitos y dolor que suele intensificarse después de las comidas [57, 58].

1.4.5. Agrandamiento de la vesícula biliar o del hígado

Si el cáncer bloquea el conducto biliar, la bilis se puede acumular en la vesícula biliar haciendo que ésta aumente de tamaño. Este agrandamiento se puede palpar durante un examen físico o en estudios por imágenes. Si el cáncer se ha propagado al hígado, también puede causar un aumento de su tamaño.

Igualmente se puede palpar en un examen físico o en estudios por imágenes [57, 58].

1.4.6. Coágulos sanguíneos

A veces, el primer signo de CP es un coágulo de sangre en una vena grande, con frecuencia en una pierna (trombosis venosa profunda). Los síntomas pueden ser dolor, hinchazón, enrojecimiento y calor en el área afectada. En otros casos, se puede desprender un fragmento de coágulo y llegar a los pulmones, dificultando la respiración y causando dolor en el pecho (embolia pulmonar) [57, 58].

1.4.7. Diabetes

En pocas ocasiones el CP destruye las células productoras de insulina causando diabetes. Los síntomas incluyen sentir sed, hambre y tener que orinar frecuentemente. Más a menudo, el cáncer produce cambios en los niveles de azúcar en la sangre que no provocan síntomas de diabetes pero que se detectan mediante análisis de sangre [57, 58].

1.5. DIAGNÓSTICO

Cuando se sospecha de un CP existen diversas herramientas básicas para diagnosticarlo:

- Pruebas generales

1.5.1. Exploración física

El médico examinará la piel y las mucosas para comprobar si están amarillas, lo cual es un signo de ictericia. Como se ha comentado en el apartado anterior, la ictericia es una manifestación clínica del CP cuando éste comienza en la cabeza del páncreas puesto que bloquea el flujo normal de la bilis conduciendo a una acumulación de la misma. Sin embargo, muchas personas con CP no presentan ictericia en el momento del diagnóstico. También palpará el abdomen para determinar si el cáncer ha producido algún cambio como puede ser agrandamiento de la vesícula biliar, como consecuencia de la acumulación de bilis, o del hígado, en caso de propagación al mismo. Otro signo de cáncer es la ascitis, que es la acumulación anormal de líquido en la cavidad abdominal [59-62].

Además, preguntará al paciente si padece dolor de abdomen o de espalda por los motivos ya comentados en el apartado de manifestaciones clínicas.

1.5.2. Análisis de sangre

Con la extracción de una muestra de sangre se pueden determinar niveles anormales de bilirrubina y otras sustancias. Los niveles de bilirrubina pueden aumentar como consecuencia de la obstrucción del colédoco debido a la presencia de un tumor en la cabeza del páncreas. Aunque hay otras causas no relacionadas con el cáncer que también conducen a niveles altos de bilirrubina como la hepatitis, la cirrosis, los cálculos biliares o la mononucleosis [59-62].

También se analizan proteínas específicas (marcadores tumorales) secretadas por las células cancerosas.

1.5.3. Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales, también llamados biomarcadores, son sustancias producidas por las células cancerosas o por células normales en respuesta a la presencia de un cáncer o también a ciertas afecciones benignas (premalignas) del cáncer. Se pueden encontrar en muestras de fluidos corporales, como sangre u orina, o en el tejido corporal.

El biomarcador sérico más utilizado y ampliamente validado para detectar el CP es el antígeno carbohidrato (CA 19-9), sin embargo, tiene una especificidad baja porque también lo producen otros tumores como el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de vesícula biliar. Niveles altos de CA 19-9 también pueden ser causados por otras afecciones no cancerosas como cálculos biliares, pancreatitis, fibrosis quística y enfermedades hepáticas [63]. Durante la radioterapia, los niveles de CA 19-9 se pueden elevar debido a que las células cancerosas al ser destruidas lo liberan al torrente sanguíneo.

Los niveles séricos de CA 19-9 preoperatorios brindan información pronóstica importante en pacientes con CP, se correlacionan con el estadio del tumor y predicen de forma independiente la supervivencia global (SG). La mayoría de los pacientes con CP tienen un CA 19-9 elevado en el momento del diagnóstico. Después del tratamiento definitivo o durante este, el aumento de las concentraciones de CA 19-9 puede identificar a los pacientes con crecimiento tumoral evolutivo. Un resultado positivo necesita confirmación con una prueba alternativa de imagen (TC). Sin embargo, la presencia de CA 19-9 normal no descarta la recidiva y no se puede considerar un índice de respuesta al tratamiento neoadyuvante [64].

Existen otros marcadores tumorales menos frecuentes pero que se pueden encontrar elevados como: CA 125, CA 242, y el antígeno carcinoembrionario (CEA). La detección de marcadores tumorales séricos favorece el diagnóstico precoz del CP y la detección conjunta de ellos ayuda a mejorar la eficiencia diagnóstica [65].

Hay marcadores tumorales que se encuentran en la pieza tumoral, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se trata de una proteína conocida también como HER1, que ejerce funciones críticas en la fisiología de las células epiteliales. Con frecuencia está mutado y/o sobreexpresado en diferentes tipos de cánceres y es el objetivo de múltiples terapias contra el cáncer actualmente adoptadas en la práctica

clínica [66].

Es necesario encontrar marcadores pronósticos que identifiquen la enfermedad mínima residual (EMR) y predigan el riesgo de recaída.

- Pruebas por imagen

1.5.4. Tomografía computarizada (TC)

Es una prueba diagnóstica que combina el uso de los Rayos X, que son radiaciones ionizantes, con tecnología informática para crear imágenes detalladas o exploraciones, de regiones internas del cuerpo. Una serie de Rayos X emitidos desde diversos ángulos son utilizados para formar cortes-secciones del cuerpo del paciente. Se puede emplear para determinar el tamaño y la localización del tumor primario y evaluar la posibilidad de diseminación a los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo. Generalmente, antes de la exploración se administra un contraste yodado, a fin de obtener mejores detalles en la imagen y poder valorar todas las estructuras (parénquima pancreático, conducto pancreático o de Wirsung, colédoco, etc.) [59-62].

1.5.5. Tomografía por emisión de positrones (PET)

Es una prueba diagnóstica que utiliza radiofármacos que se distribuyen por todo el cuerpo. Se inyecta en el organismo una pequeña cantidad de una sustancia azucarada radiactiva a través de una vena, generalmente del brazo. Esta sustancia azucarada es absorbida por las células que utilizan una mayor cantidad de energía. Debido a que el cáncer tiende a utilizar energía de manera activa, absorbe una cantidad mayor de la sustancia radioactiva. El radiofármaco no tiene efectos secundarios y la radiación que emite es mínima. La radiación emitida por el radiofármaco es detectada por la máquina de PET, generándose imágenes multicolores de los órganos y los tejidos internos del cuerpo. Las exploraciones por PET se diferencian de las exploraciones por TC en que las exploraciones por TC observan el tumor en relación con su anatomía, mientras que las exploraciones por PET miden la actividad metabólica [59-62].

1.5.6. Resonancia magnética (RM)

Es una prueba diagnóstica que utiliza un campo magnético y ondas de radiofrecuencia para obtener imágenes de distintas áreas del cuerpo. Se puede usar para medir el tamaño del tumor. Se administra un medio de contraste antes de la exploración, a fin de crear una imagen más clara. La colangiopancreatografía por resonancia magnética (CPRM) es un tipo especializado de RM que emplea un software informático desarrollado específicamente para examinar problemas pancreáticos, como obstrucciones de conductos y quistes[59-62].

1.5.7. Ecografía

Esta prueba diagnóstica utiliza ondas de sonido para crear una imagen de los órganos internos. Permite diferenciar un páncreas normal de otro anormal y las pancreatitis de las neoplasias malignas [59-62].

Existen dos tipos de dispositivos de ultrasonido:

- Un dispositivo de ultrasonido transabdominal: se coloca sobre la parte externa del abdomen y se mueve lentamente para producir una imagen del páncreas y las estructuras circundantes.
- El dispositivo de ultrasonido endoscópico (USE): se introduce a través de la boca y el estómago del paciente hacia el intestino delgado un tubo delgado iluminado que se mueve lentamente alrededor del área para obtener una imagen del páncreas. Este procedimiento es muy especializado y requiere de la presencia de un gastroenterólogo que posea capacitación específica en esta área. Generalmente, se aplican sedantes al paciente para que duerma durante el procedimiento. También puede realizarse una biopsia en el mismo momento que se está realizando este procedimiento.
- Biopsia

1.5.8. Biopsia de tejido

Una biopsia es la extirpación de una pequeña cantidad de tejido del área del cuerpo donde puede haber cáncer para su examen con microscopio. Otras pruebas pueden indicar la presencia de cáncer, pero, en casi todos los tipos de cáncer, solo una biopsia permite formular un diagnóstico definitivo. El tejido se envía a un laboratorio donde un patólogo lo examina bajo un microscopio para detectar células cancerosas [59-62].

Existen dos tipos:

- Biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF): utiliza una aguja pequeña adherida a una jeringa que se introduce en el páncreas para succionar las células. Se extraen cantidades muy pequeñas de células de tejido. Generalmente se realiza con un USE (comentado anteriormente) o a través de la piel, guiado por TC.
- Biopsia core o biopsia con aguja gruesa: extrae muestras de tejido por medio de una aguja hueca unida a un dispositivo de sujeción por resorte para extraer una porción más grande de tejido, que puede ser útil para las pruebas moleculares o genéticas del tumor.

1.5.9. Biopsia líquida (hablaremos en el apartado 2 de este mismo capítulo)

1.6. CLASIFICACIÓN

1.6.1. Según grado de diferenciación

Incluso cuando es resecable, el CP tiene una tendencia natural a la diseminación muy temprana. El grado describe cuán parecido es el cáncer al tejido normal cuando se observa al microscopio:

- G1 (grado bajo o bien diferenciado): el cáncer se parece mucho al tejido normal del páncreas.
- G2 (grado intermedio o moderadamente diferenciado): tiene características intermedias.
- G3 (grado alto o pobremente diferenciado): el cáncer se ve muy anormal.

Los cánceres de páncreas de bajo grado (G1) crecen y se diseminan más lentamente que los cánceres de alto grado (G3). En la mayoría de los casos, G3 tiene peor pronóstico que los cánceres G1 o G2 [67-69].

1.6.2. Según el sistema TMN

Una vez diagnosticado hay que determinar la etapa en que se encuentra. Este proceso se llama estadificación y el sistema que se emplea con más frecuencia para ello es el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que se basa en tres piezas clave de información:

- La extensión del tumor (T): ¿Qué tan grande es el tumor y ha crecido fuera del páncreas en los vasos sanguíneos cercanos?
- La propagación a los ganglios (nódulos) linfáticos adyacentes (N): ¿Se ha propagado el cáncer a los ganglios linfáticos adyacentes? De ser así, ¿cuántos de los ganglios linfáticos tienen cáncer?
- La propagación (metástasis) a sitios distantes (M): ¿Se ha propagado el cáncer a ganglios linfáticos distantes o a órganos distantes como el hígado, el peritoneo (la membrana que recubre la cavidad abdominal), los pulmones o los huesos?

Una vez determinadas las categorías T, N y M, esta información se combina en un proceso llamado agrupación por etapas para asignar una etapa general (Tabla 1) [70-72].

Tabla 1. Estadificación del tumor según el sistema TNM del AJCC [70-72].

Etapa AJCC	Agrupación por etapas	Descripción de la etapa*
0	Tis N0 M0	El tumor está confinado a las capas superiores de células del conducto pancreático y no ha invadido los tejidos más profundos. No se ha propagado fuera del páncreas. A estos tumores a veces se les conoce como carcinoma <i>in situ</i> (Tis). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IA	T1 N0 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y no mide más de 2 cm (0,8 pulgadas) de ancho (T1). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IB	T2 N0 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 2 cm (0,8 pulgadas) pero no más de 4 cm (1,6 pulgadas) de ancho (T2). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIA	T3 N0 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 4 cm (1,6 pulgadas) de ancho (T3). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIB	T1 N1 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y no mide más de 2 cm (0,8 pulgadas) de ancho (T1) y se ha propagado a no más de 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T2 N1 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 2 cm (0,8 pulgadas) pero no más de 4 cm (1,6 pulgadas) de ancho (T2) y se ha propagado a no más de 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T3 N1 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 4 cm (1,6 pulgadas) de ancho (T3) y se ha propagado a no más de 3 ganglios linfáticos adyacentes (N1). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
III	T1 N2 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y no mide más de 2 cm (0,8 pulgadas) de ancho (T1) y se ha propagado a 4 o más ganglios linfáticos adyacentes (N2). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T2 N2 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 2 cm (0,8 pulgadas) pero no más de 4 cm (1,6 pulgadas) de ancho (T2) y se ha propagado a 4 o más ganglios linfáticos adyacentes (N2). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T3 N2 M0	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 4 cm (1,6 pulgadas) de ancho (T3) y se ha propagado a 4 o más ganglios linfáticos adyacentes (N2). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T4 Cualquier N M0	El cáncer está creciendo fuera del páncreas y en los vasos sanguíneos principales adyacentes (T4). El cáncer pudiera o no haberse propagado a los ganglios linfáticos cercanos (cualquier N). No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IV	Cualquier T Cualquier N M1	El cáncer se ha propagado a sitios distantes tales como el hígado, el peritoneo (le membrana que recubre la cavidad abdominal), los pulmones o los huesos (M1). El cáncer puede ser de cualquier tamaño (cualquier T) y podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (cualquier N).

*Las siguientes categorías adicionales no están incluidas en la Tabla 1:

- TX: información insuficiente para evaluar el tumor primario.
- T0: no existe evidencia de tumor primario.
- NX: por falta de información no se puede evaluar la afectación ganglionar.

1.7. TRATAMIENTO

El ADCP tiene un pronóstico muy pobre. Generalmente, solo el 24% de las personas sobreviven 1 año después del diagnóstico y el 9% sobreviven 5 años [73]. Las opciones de tratamiento se eligen en función de la extensión del cáncer. De acuerdo con la evaluación por imágenes, TC y resonancia magnética nuclear (RMN), el CP se puede dividir en [6, 72]:

- Resecable: se puede extraer por completo mediante cirugía.
- Resecable limítrofe: el cáncer podría acabar de llegar hasta los vasos sanguíneos cercanos, pero aun así podría extraerse completamente mediante cirugía.
- Irresecable (localmente avanzado o con metástasis a distancia): no se puede extraer completamente mediante cirugía.

Tipos de tratamiento:

1.7.1. Tratamiento paliativo

El cuidado paliativo pretende hacer que el paciente se sienta más cómodo. La definición de cuidado paliativo es "hacer que una enfermedad o sus síntomas sean menos graves o angustiantes sin eliminar la causa". Los cuidados paliativos forman parte de un tratamiento integral para el cuidado de las molestias, los síntomas y el estrés de toda enfermedad grave. No reemplazan el tratamiento primario, sino que contribuyen al tratamiento primario que recibe. Su objetivo es evitar y aliviar el sufrimiento, y mejorar la calidad de vida del paciente.

1.7.2. Tratamiento con intención curativa

El tratamiento curativo es el que tiene intención de curar la enfermedad. La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia se usan tradicionalmente para alargar la supervivencia y/o aliviar los síntomas de los pacientes.

El CP se diagnostica generalmente en una etapa avanzada, y el 80-90% de los pacientes tienen tumores no resecables en el momento del diagnóstico [4].

- **Cirugía:** la cirugía es la única opción terapéutica curativa que puede ayudar a aumentar significativamente la supervivencia de los pacientes. De hecho, la pancreatectomía puede prolongar la supervivencia de los pacientes con CP en etapa temprana en al menos 2 años [74]. Sin embargo, incluso cuando la resección se realiza con éxito, la tasa de SG de 5 años sigue siendo de alrededor del 10-25%; pero si el cáncer se ha diseminado a otros órganos o tejidos circundantes, la tasa de supervivencia a 5 años es del 12% post-quirúrgico. El 52% de las personas diagnosticadas después de que el cáncer se ha diseminado a una parte distante del cuerpo, tiene una tasa de supervivencia a 5 años del 3%. A pesar de la resección radical (R0), presentará recaídas locales o a distancia después de la cirugía, el 80% de los pacientes.
- **Quimioterapia:** la quimioterapia es una técnica terapéutica que consiste en la administración de sustancias químicas para destruir células cancerosas. La quimioterapia adyuvante después de la cirugía puede mejorar la mediana de SG en comparación con la ausencia de quimioterapia [75-79], sin embargo, sólo el 15-20% de los pacientes con CP son candidatos a cirugía debido a la presentación tardía de la enfermedad [13]. Las guías terapéuticas recomiendan quimioterapia adyuvante con la pauta modificada de 5-fluorouracilo leucovorina-irinotecán-oxalipaltino (mFOLFIRINOX) durante 6 meses [80]. Este esquema logra una mediana de SG de 54,4 meses y una mediana de supervivencia libre de enfermedad (SLE) de 21,6 meses. Esto supone un beneficio de SG de 19,4 meses y de SLE de 8,8 meses en comparación con la gemcitabina sola (SG de 35,0 meses y SLE de 12,8 meses). En cuanto al tiempo de aparición de metástasis, también se alarga (30,4 meses con mFOLFIRINOX frente a 17 meses con gemcitabina). A pesar de la mejoría que supone este tratamiento, el 60% de los pacientes seguirá recayendo a los 3 años [81]. En el ADCP borderline-resecable es común el tratamiento neoadyuvante (quimioterapia de inducción y/o quimiorradioterapia) con posterior cirugía. Esta estrategia promueve la resección

completa, aumenta la probabilidad de lograr márgenes de resección negativos y mejora la SG [82-84]. La quimioterapia sistémica paliativa es el tratamiento estándar para los pacientes con ADCP localmente avanzado y metastásico. Actualmente existen dos opciones de tratamiento estándar, FOLFIRINOX y la combinación de gemcitabina y nab-paclitaxel. En comparación con la gemcitabina sola, FOLFIRINOX mejora la mediana de SG en 4,3 meses (11,1 meses frente a 6,8 meses) [81] mientras que la adición de nab-paclitaxel a la gemcitabina mejora la mediana de SG en 1,7 meses (8,5 meses frente a 6,8 meses) [85]. A pesar del desarrollo durante los últimos años de nuevos esquemas de quimioterapia (FOLFIRINOX y gemcitabina más nab-paclitaxel), la mediana de SG sigue siendo inferior a 12 meses [55].

- **Radioterapia:** La radioterapia es una forma de tratamiento basada en el empleo de radiaciones ionizantes para tratar el cáncer, bien para curarlo o para retrasar su progresión. La radiación no solo destruye o enlentece el crecimiento de las células cancerosas, también puede afectar las células sanas de alrededor. El daño a las células sanas puede causar efectos secundarios. En los ADCP localmente avanzados en los que la quimioterapia de inducción consigue el control de la enfermedad, la radioterapia puede ser una opción.

Para los pacientes que son sometidos a cirugía, otro factor importante es la extensión de la resección (si se extirpó el tumor por completo) [72]:

- **R0:** se cree que se ha eliminado todo el cáncer (no hay signos visibles o microscópicos que sugieran que ha quedado cáncer).
- **R1:** se extirpó todo el tumor visible, pero las pruebas de laboratorio del tejido extraído muestran que probablemente quedaron algunas áreas pequeñas de cáncer.
- **R2:** no se pudo extirpar parte del tumor visible.

1.8. PRONÓSTICO Y RESULTADOS A DISTANCIA

1.8.1. Mortalidad

Tanto en EEUU como en la UE, si atendemos los últimos datos ofrecidos por la World Health Organization Database y Eurostat, el ADCP es la única neoplasia que no muestra una tendencia hacia la mejoría en las tasas de mortalidad en ambos sexos [86] (Fig. 6).

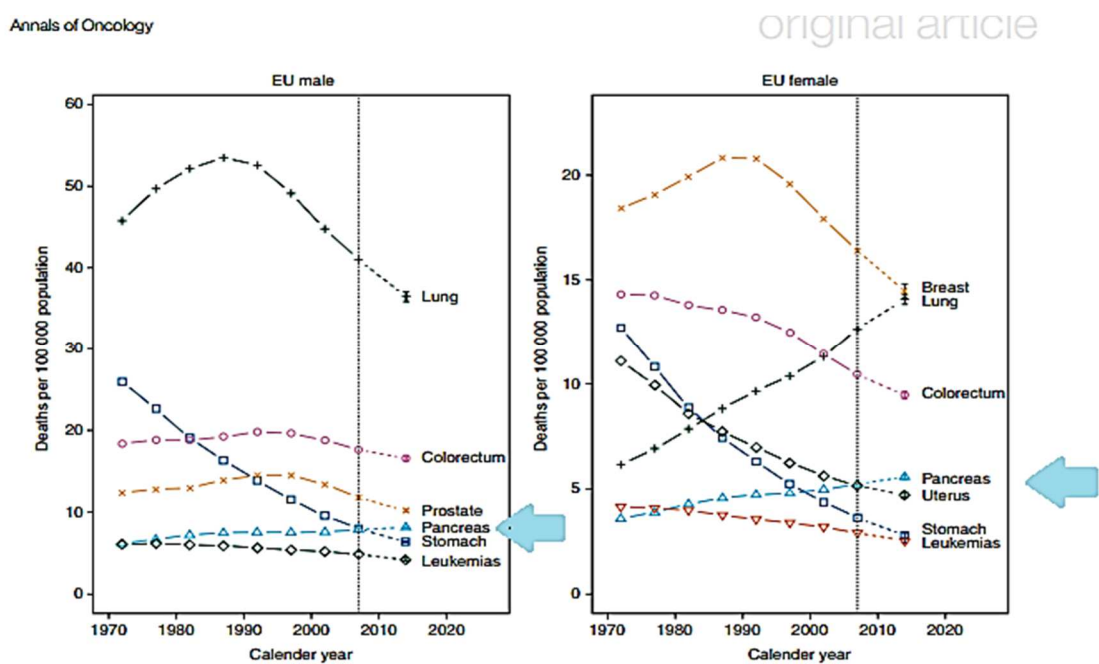


Fig. 6. Tendencia de la mortalidad para el cáncer en hombres y mujeres de la UE en quinquenios desde 1970-1975 hasta 2005-2009. Las flechas señalan la tendencia ascendente del CP (Curva azul con triángulos) [86].

A pesar de que en los grupos de edad más jóvenes (25-45 años) parece existir una mejor supervivencia en los varones, en el género femenino no ocurre esto [86]. El CP en las mujeres y a cualquier edad presenta una mayor tendencia hacia el ascenso de la mortalidad desde los años 70, mientras que, en los hombres parece que se ha alcanzado una fase de “plateau” desde finales de la década de los 80. Estos datos reflejan probablemente la tendencia del hábito tabáquico de las últimas generaciones de mujeres y hombres europeos [86]. Por otro lado, a pesar de las mejoras en las pruebas de imagen que permiten diagnosticar la presencia del CP a lo largo de los distintos países, la ausencia de síntomas de la enfermedad y de un test de cribado que permita el diagnóstico precoz hace que el tratamiento continúe siendo tardío. Esta situación

dificulta la tendencia hacia la mejoría en la curva de supervivencia de estos pacientes.

En caso del CP metastásico la supervivencia es aún menor. La metástasis del cáncer representa el 90% de todas las muertes relacionadas con el cáncer y es el principal factor determinante entre los cánceres de bajo riesgo, tratables mediante vigilancia activa, extirpación quirúrgica o terapia adyuvante, y los cánceres de alto riesgo que requieren un tratamiento terapéutico agresivo [87].

1.8.2. Metástasis como factor determinante del pronóstico

La metástasis es un proceso dinámico de múltiples etapas que involucra la compleja interacción de factores intrínsecos del tumor y del huésped [88]. Las células cancerosas metastásicas necesitan evadir, resistir y modificar la cascada de respuesta inmunitaria del huésped para poder proliferar, migrar, colonizar y permanecer inactivas durante períodos prolongados [88]. Esto requiere la capacidad de comunicarse a través de factores solubles (vesículas extracelulares (VEs) y citoquinas), ser genética y fenotípicamente neoplásicas para hacer la transición de célula epitelial a mesenquimal para la migración y reaccionar a los mecanismos de protección del huésped como anoikis, tensión de cizallamiento e inmunidad del huésped [89-92].

Específicamente, las células tumorales metastásicas necesitan:

- 1) Remodelar la MEC del huésped para remodelar las fibrillas de colágeno
- 2) Promover la neoangiogénesis
- 3) Separarse de las células vecinas en el tumor sólido
- 4) Formar invadopodios e invadir el tejido circundante a lo largo de la MEC recién alineada
- 5) Intravasarse a través del revestimiento de células endoteliales de la vasculatura para ingresar en el sistema circulatorio sanguíneo o linfático
- 6) Viajan por la circulación del huésped como células tumorales circulantes (CTCs)
- 7) Forman agregados CTCs-plaquetas
- 8) Se adhieren al revestimiento de células endoteliales de un sitio distante del tumor primario
- 9) Forman nuevamente invadopodios para extravasarse a través del revestimiento de células endoteliales de la vasculatura y salir del sistema circulatorio

10) Colonizan y proliferan en el tejido nuevo para generar un tumor secundario

Estos pasos específicos pueden considerarse limitantes de la velocidad debido a su baja eficiencia y frecuencia resultante. Por lo que se pueden considerar cuellos de botella en el proceso de la metástasis del cáncer y son, por tanto, ideales para atacar terapéuticamente [87, 89].

Las células cancerosas son heterogéneas y la metástasis es un proceso muy selectivo [88]. En 1889, la metástasis fue descrita por el médico británico Stephen Paget que formuló la teoría de “la semilla y el suelo”: la “semilla” se refiere a ciertas células tumorales con potencial metastásico, y el “suelo” es cualquier órgano o tejido que proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento de las semillas. La metástasis sólo ocurre si la semilla y el suelo son compatibles [93].

1.8.2.1. Inicio de la metástasis

El proceso de metástasis comienza con la liberación de células tumorales de las células vecinas y la MEC, incluidas las membranas basales. Además, las células tumorales adquieren propiedades de tipo mesenquimatoso a través de un proceso llamado transición epitelio-mesénquima (EMT), mediado por el cambio de la molécula de cadherina, que implica la regulación a la baja de la E-cadherina y la regulación al alza de las cadherinas mesenquimales como la N-cadherina, la integrina $\alpha\beta6$, la vimentina y la metaloproteinasas de matriz. Tales células pueden adoptar un fenotipo móvil, adquirir capacidad migratoria e interactuar con componentes de la MEC contribuyendo a ella mediante la síntesis y organización de nuevos componentes. También modelan la MEC mediante la producción de metaloproteínas que degradan la matriz. Esta pérdida de adherencias célula-célula permite que las células tumorales se disocien del tumor primario y los cambios en la interacción célula-matriz permiten que las células invadan el estroma circundante. Al mismo tiempo que las células móviles atraviesan la membrana basal y la MEC, algunas células tumorales penetran en los vasos sanguíneos, entrando así en la circulación (intravasación) [93] (Fig. 7).

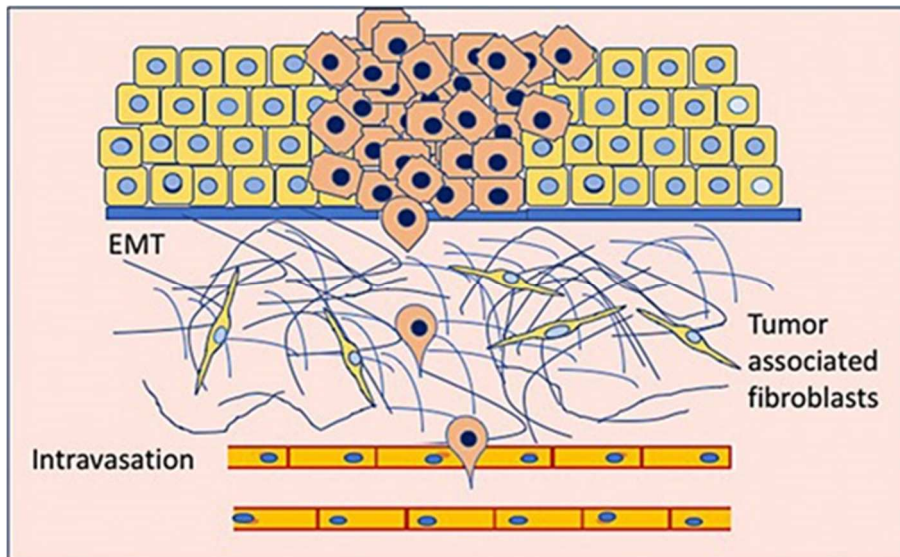


Fig. 7. Las células de carcinoma invaden el estroma y se someten a EMT. La célula tumoral invasora puede penetrar en un vaso sanguíneo, entrando así en la circulación (intravasación) [93].

Después de la intravasación, las células tumorales se adhieren a las plaquetas que las protegen de las fuerzas físicas destructivas como las fuerzas de cizallamiento hemodinámico y de las células natural killer (NK). También se produce una activación de la trombosis con depósito de fibrina. La agregación de plaquetas, fibrina y células tumorales crea un complejo que actúa como un émbolo (Fig. 8).

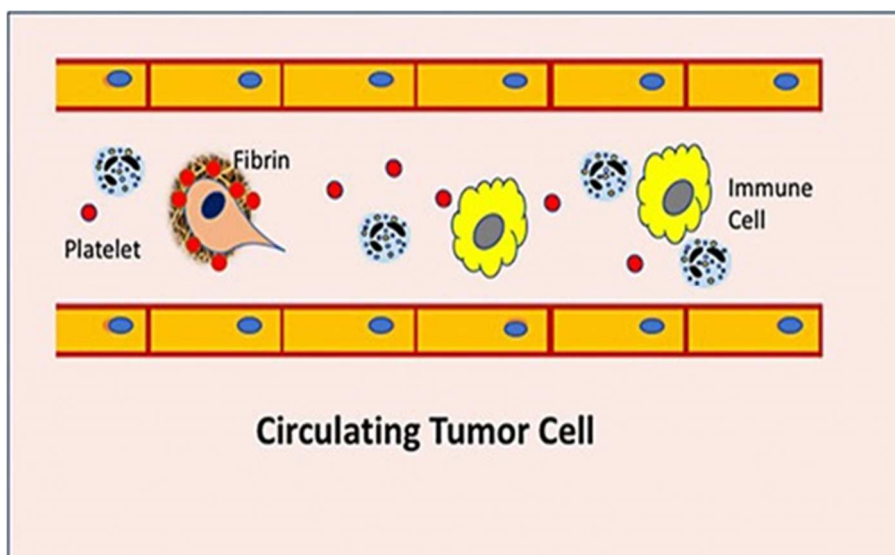


Fig. 8. Después de la intravasación, la célula tumoral puede adherirse a plaquetas y fibrina que la protegen del sistema inmunitario [93].

A partir de este punto, las células tumorales se alejan del sitio primario, circulan por el torrente sanguíneo y, las que sobreviven, salen de la circulación sanguínea mediante un proceso conocido como extravasación. Las células tumorales penetran en la pared vascular, entran en el tejido del órgano huésped y experimentan una transición mesénquimo-epitelial (MET). Ahora se denominan células tumorales diseminadas (CTDs) (Fig. 9).

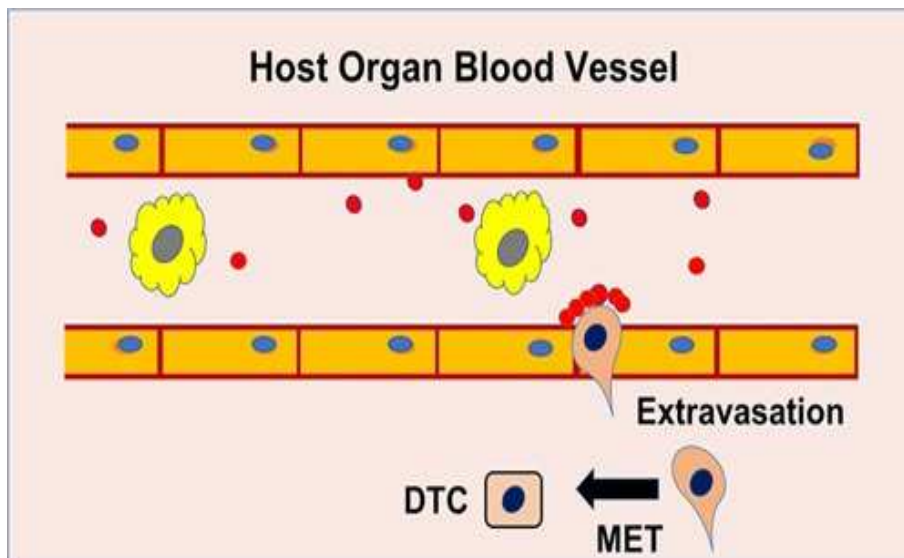


Fig. 9. La célula tumoral sale de la circulación (extravasación), penetra en la pared vascular y entra en el tejido del órgano huésped donde se somete a MET [93].

La selección del sitio de crecimiento tumoral implica interacciones entre las células metastásicas y el medio que las rodea, probablemente la unión específica a las células endoteliales. Las células endoteliales en la vasculatura de distintos órganos expresan distintos receptores de superficie celular y factores de crecimiento que pueden influir en el fenotipo de las correspondientes metástasis [93, 94].

El hecho de que las células tumorales lleguen y colonicen nuevos entornos potencialmente hostiles no significa que sobrevivan y proliferen en la nueva ubicación. Sin embargo, es un requisito crucial para el desarrollo de un tumor secundario en la nueva ubicación. Sólo una pequeña fracción de estas células consiguen la extravasación (<0,1%) y se estima que <0,01% de las CTCs logran crecimientos secundarios [93].

Después de la extravasación, las CTDs entran en una etapa de latencia tumoral que puede durar desde algunas semanas hasta décadas. En latencia celular, las células tumorales pueden eliminarse por el sistema inmunitario o sufrir apoptosis, como células aisladas o en forma de micrometástasis. Esta es una lesión

metastásica en la que las células tumorales forman pequeños agregados en los que la tasa de proliferación y el desgaste de las células tumorales están equilibrados, por lo que, a pesar de la proliferación activa de células tumorales, el tamaño del tumor sigue siendo demasiado pequeño para la detección clínica por métodos convencionales [95-97] (Fig. 10).

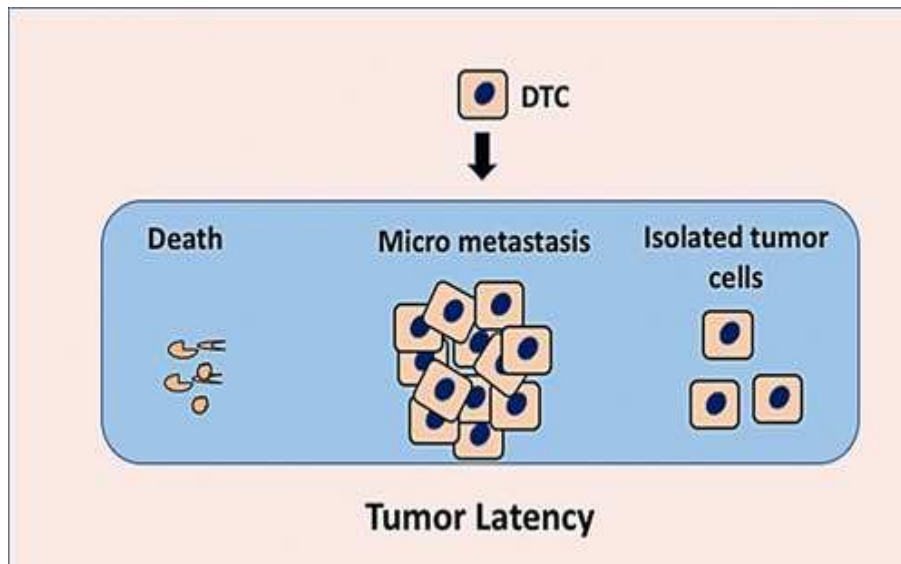


Fig. 10. Después de la extravasación, las CTDs entran en etapa de latencia tumoral [93].

La duración de la latencia metastásica varía entre los tipos de cáncer, y para los más agresivos es muy corta, lo que resulta en altas tasas de recaída y mortalidad después del diagnóstico.

1.8.2.2. Nicho metastásico y macrometástasis

Las CTDs necesitan tiempo para alterar o desencadenar las funciones necesarias para la iniciación y expansión del tumor en el sitio secundario. Para que se establezca la metástasis tienen que ocurrir varios eventos cruciales, de los cuales los más importantes son la actividad del ciclo celular y la angiogénesis. El microambiente del tejido huésped juega también un papel clave en la adquisición del fenotipo proliferativo por parte de las células tumorales. Este microambiente comprende células estromales no neoplásicas de apoyo, factores solubles, redes vasculares, nutrientes y componentes metabólicos, y la arquitectura estructural de la MEC. Con la composición genética correcta de las células para determinar su fenotipo maligno acompañada

de un entorno favorable en el órgano huésped, las células tumorales pueden proliferar y convertirse en una macrometástasis clínicamente detectable [93].

1.8.2.3. Nicho premetastásico

El nicho premetastásico se define como un microambiente tisular receptivo y de apoyo que experimenta cambios moleculares y celulares para formar los sitios metastásicos antes de la llegada del tumor metastásico.

El proceso de formación de nichos premetastásicos en órganos distantes lo inicia el tumor primario, el cual secreta factores antes de la diseminación tumoral [98]. Estos factores aumentan la proliferación de células estromales similares a fibroblastos, que contribuyen al depósito local de fibronectina. Los factores secretados derivados del tumor promueven la formación de nichos premetastásicos al movilizar y reclutar células progenitoras hematopoyéticas derivadas de médula ósea (VEGFR1+) directamente de la médula ósea al nicho premetastásico [99-101].

La formación de nichos premetastásicos se beneficia en gran medida de la presencia de un sistema inmunitario suprimido. El tumor primario recluta células mieloides, precursoras de las células inmunitarias. Estas células permiten que las células tumorales evadan el reconocimiento por parte del sistema inmunitario a medida que hacen metástasis, lo que permite que la metástasis proliferen. Una vez que el tumor primario ingresa al torrente sanguíneo, las células mieloides que han sido reclutadas por el tumor protegen a las células cancerosas evitando que sean detectadas por el sistema inmunitario. Dado su importante papel en la protección de la metástasis en crecimiento de los ataques del sistema inmunitario, las células mieloides son un factor clave en el desarrollo del nicho premetastásico y, por lo tanto, en el desarrollo de la metástasis [100, 102].

Las quimiocinas también juegan un papel importante en la creación de nichos premetastásicos y el desarrollo de metástasis. Para evadir la detección por parte del sistema inmunitario, el tumor primario utiliza quimiocinas para aumentar el reclutamiento de células mieloides derivadas de la médula ósea en los órganos secundarios. Además, las células cancerosas del tumor primario pueden usarse para inducir inflamación en el sitio futuro del nicho premetastásico en el órgano secundario, que es como la respuesta inmunitaria creada

por una infección. Por lo tanto, la gran presencia de células inmunitarias permite que el nicho premetastásico evada los ataques del sistema inmunitario y, por lo tanto, permite que el tumor metastatice sin inhibición [100, 103].

La formación de un nicho premetastásico no implica solamente el reclutamiento de células extrañas, como las células inmunitarias, sino también la reprogramación de las células estromales residentes para facilitar el crecimiento metastásico [99, 100, 104].

1.8.2.4. Exosomas y metástasis tumoral

Los exosomas son nanovesículas de membrana de bicapa lipídica, esféricas o en forma de copa, de 40 a 100 nm de diámetro. Estas vesículas son secretadas por muchas células y se encuentran en la mayoría de los fluidos corporales, como la orina y la sangre, así como en los sobrenadantes de células cultivadas [105].

La formación de exosomas es un proceso afinado que incluye 4 etapas: iniciación, endocitosis, formación de cuerpos multivesiculares y secreción de exosomas. Los cuerpos multivesiculares son estructuras endocíticas formadas por la gemación de una membrana endosomal en la luz del compartimento. Después de la acumulación vesicular, los cuerpos multivesiculares se clasifican para la degradación de la carga en el lisosoma o se liberan al espacio extracelular como exosomas al fusionarse con la membrana plasmática [106].

Los exosomas pueden traspasar sus constituyentes y carga a células próximas o distantes mientras mantienen su función. Hay varios mecanismos para la captación de exosomas por las células receptoras, como la fusión del exosoma con la membrana de la célula receptora, la endocitosis por fagocitosis y la interacción receptor-ligando [107]. Los exosomas ahora se consideran mediadores importantes en la comunicación intercelular.

Se ha observado que las células cancerosas secretan cantidades mucho mayores de exosomas que las células no transformadas. Estos exosomas no solo afectan las células tumorales proximales y las células del estroma en el microambiente local, sino que también pueden ejercer efectos sistémicos al intervenir en la circulación sanguínea.

Los exosomas pueden traspasar proteínas y ácidos nucleicos específicos a las células receptoras en el

microambiente del tumor o en sitios distantes específicos, por lo que los cánceres los utilizan como una herramienta mediante la cual las células cancerosas transfieren el fenotipo maligno a las células normales y establecen un microambiente local y distante apropiado para ayudar al crecimiento de células cancerosas. Los exosomas contribuyen a la metástasis tumoral al mejorar la migración e invasión de células tumorales, remodelar la MEC y establecer un nicho premetastásico [105, 108, 109].

2. BIOPSIA LÍQUIDA

2.1. BIOPSIA LÍQUIDA

El tratamiento del cáncer ha mejorado notablemente debido a un mayor conocimiento de las anomalías moleculares que impulsan su desarrollo. Esto ha llevado a terapias dirigidas contra el cáncer cada vez más eficaces. A la luz de estos avances, las pruebas con biomarcadores para la estratificación de los pacientes con cáncer se han vuelto obligatorias. Estas pruebas se realizan de forma rutinaria mediante biopsia/material citológico de tumores primarios obtenido en el momento del diagnóstico. Si bien este enfoque es adecuado con fines diagnóstico, no lo es para el seguimiento del paciente durante la progresión de la enfermedad y la eventual recaída [110].


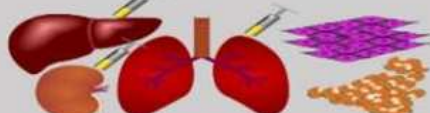
Liquid biopsy			Traditional biopsy
CTCs	cfNA		Sample cells or tissues
	cfDNA	cfRNA	
		Exosomes	
Sample derived from body fluid (usually blood)			Sample derived from surgical biopsy or needle biopsy
Non-invasive			Invasive
Less risk and pain			Some risk and pain
Easily and repeatedly obtained			Often not easily or repeatedly obtained
Real time detection of comprehensive tissue profile			Spatially and temporally limited tissue profile

Fig. 11. Diferencias entre la biopsia líquida y la biopsia tradicional [111]

El concepto de biopsia líquida (BL) se introdujo en oncología con el fin de eliminar los procedimientos invasivos necesarios para obtener muestras de tejido (Fig. 11) y proporcionar información sobre la respuesta a la terapia y la recaída de la enfermedad en tiempo real [110].

La BL, basada en análisis de sangre mínimamente invasivos, proporciona una herramienta poderosa y confiable para el perfil molecular individual de pacientes en tiempo real. Se puede obtener información importante a través del aislamiento y el análisis molecular de CTCs, ADN tumoral circulante (ADNct), microARN (miARNs) circulantes, y VEs derivadas de tumores en varios fluidos corporales, principalmente sangre periférica, pero también orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural y otros. La BL se centra en la detección temprana del cáncer, mejorando la estadificación del cáncer, la detección precoz de la recaída, el seguimiento en tiempo real de la eficacia terapéutica, la detección de dianas terapéuticas y los mecanismos de resistencia [112].

2.1.1. ADN libre circulante

El ADN libre circulante (cfDNA) son moléculas de ADN degradadas que las células liberan al torrente sanguíneo. Estos fragmentos, que pueden variar en longitud entre 50 y 300 pares de bases, están casi ausentes en individuos sanos. Sin embargo, los niveles elevados de cfDNA en sangre se observan comúnmente en tumores malignos, inflamación crónica y muerte celular excesiva. Los diversos tipos de cfDNA aislados de sangre humana con fines de diagnóstico y detección incluyen el ADNct, el ADN mitocondrial (ADNmt) y el ADN fetal [113].

Las células tumorales liberan fragmentos de ADN en la circulación para la remodelación del microambiente a distancia. Este ADNct es uno de los analitos más investigados de la BL. Los estudios han sugerido su potencial para la detección temprana del cáncer y la predicción de su recurrencia [114]. El ADNct es un tipo de fragmento de ADN liberado en la sangre por apoptosis y necrosis de las células tumorales, presente en altas concentraciones en la sangre de los pacientes con cáncer. Debido a su origen, el ADNct contiene todas las características genéticas, como las mutaciones, amplificaciones, deleciones y/o translocaciones, que tienen las células tumorales primarias y metastásicas. Los ADNct que se originan a partir de células tumorales permiten detectar tumores, reflejar la carga tumoral y monitorizar la respuesta a las terapias [111, 113].

Los estudios han demostrado que el análisis del cfDNA es un método más sensible para identificar

cambios genéticos específicos de tumores que las biopsias tradicionales o la evaluación de biomarcadores normales utilizados en la clínica.

2.1.2. Exosomas

Los exosomas (comentados anteriormente) son vesículas de membrana de origen endocítico, secretadas tanto por células normales como cancerosas hacia el espacio extracelular y hacia la circulación sanguínea. Estas VEs pueden transmitirse como moléculas de señalización entre las células cancerosas y su microambiente a través de la transferencia horizontal de información de sus cargas que incluyen proteínas, ADN, ARN mensajero (ARNm) y miARN. Por lo tanto, los exosomas se pueden considerar indicadores biológicos potenciales de diferentes tipos de cáncer y se pueden usar para la detección temprana de CP, puesto que están presentes en la sangre antes que los causados por la necrosis (ADNct), mediante la prueba y el análisis de los niveles de proteínas, ácidos nucleicos o ambos que se han encontrado en los fluidos corporales [6, 111].

2.1.3. Células tumorales circulantes

Las CTCs son células cancerosas que derivan de tumores primarios antes de la metástasis y que se liberan en la sangre periférica. Pueden desprenderse del tumor durante las primeras etapas de formación y desarrollo del mismo. Se observan en la sangre periférica de pacientes con todo tipo de cáncer, pero rara vez en individuos sanos o con enfermedades no malignas. Son raras, sin embargo, se cree que la cantidad de CTCs en la sangre de los pacientes con cáncer se correlaciona con el desarrollo del tumor, la respuesta al tratamiento, la recidiva del tumor y el pronóstico a largo plazo de muchos tipos de cáncer. A pesar de ello, su función en el CP aún no se ha definido por lo que es un extenso campo de investigación. Es por ello que el presente estudio se va a centrar en su análisis [111].

2.2. CTCs Y CLUSTERS

La importancia pronóstica y predictiva de las CTCs, se ha demostrado a través de numerosos estudios clínicos en la mayoría de los cánceres sólidos (366 registrados en <http://clinicaltrials.gov>). Se han desarrollado y validado muchas técnicas para el enriquecimiento, detección y caracterización molecular de CTCs [115]. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se realizaron en pacientes con cáncer en etapa avanzada, donde el número de CTCs es mayor que en la etapa inicial. El próximo objetivo del análisis de CTCs es la detección y caracterización de la EMR [116]. Muchos estudios clínicos han demostrado que la detección de CTCs en la sangre periférica de pacientes sin síntomas clínicos ni signos radiológicos de metástasis se relaciona con la recurrencia (Fig. 12). La caracterización molecular de las CTCs proporciona información importante para la presencia de dianas terapéuticas y mecanismos de resistencia, que es fundamental para el manejo de pacientes con cáncer [117].

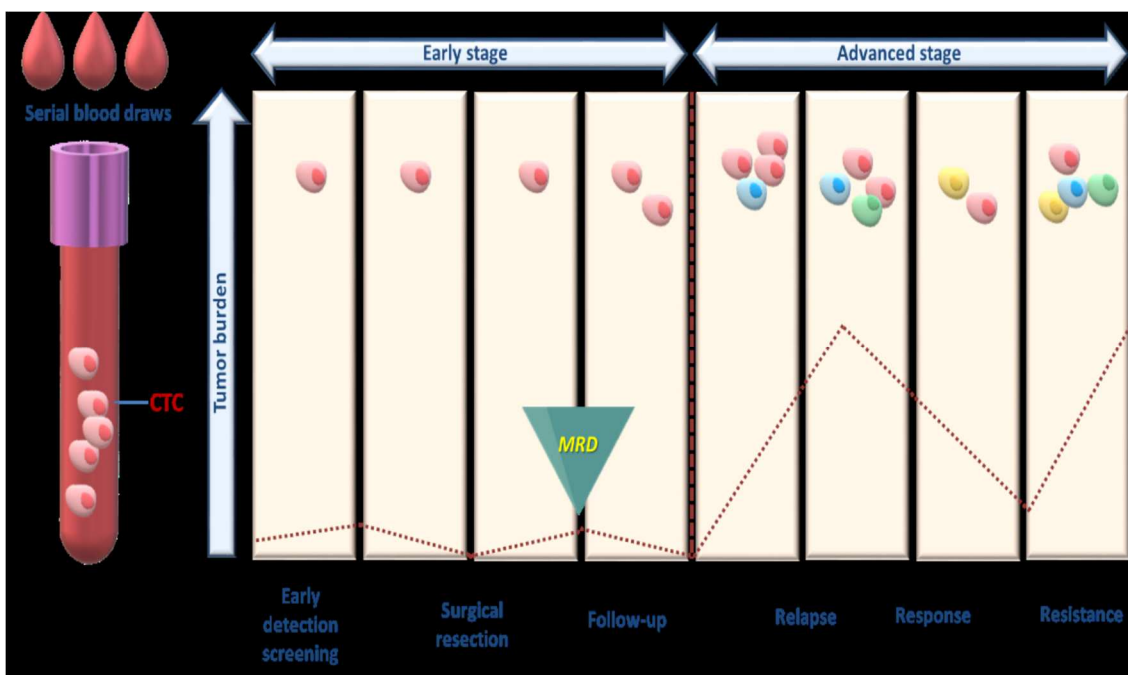


Fig. 12. Aplicaciones del análisis de CTCs para el seguimiento de pacientes oncológicos [112].

Las células que se desprenden del tumor primario y migran a través del torrente sanguíneo se denominan células tumorales circulantes (CTCs). Evidencia de que las CTCs se derivan de clones del tumor primario, sugiere que pueden reflejar la carga tumoral en todas las etapas de la progresión tumoral. Las CTCs

dependientes de los clones del tumor primario pueden ser detectadas incluso antes que el tumor donde se originan e incluso se identifican, y a menudo persisten, después de que el tumor se ha extirpado. Por tanto, la determinación de CTCs ayudaría a estudiar aspectos fundamentales de la Oncología, tanto en lo referente al diagnóstico como a la estadificación y al pronóstico. Además, las CTCs pueden jugar un papel importante en caracterizar los cambios genéticos e inmunofenotípicos con la progresión del tumor, lo que ayuda a guiar la terapia dirigida [115].

2.2.1. Caracterización de CTCs

El aislamiento de CTCs viables permite el análisis de su caracterización molecular y funcional, ya que son bioquímicamente diferentes de las células sanguíneas. Una de las moléculas de superficie más común en las CTCs es la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), que se origina a partir del epitelio. EpCAM es una glicoproteína transmembrana presente en el 80% de los tumores sólidos, pero ausente en células sanguíneas periféricas [118]. Otras alternativas son la CK19, el antígeno específico de tumor 9 y el péptido liberador de progastina. De manera similar, muchos marcadores inmunitarios tumorales, como el antígeno prostático específico (PSA), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y el EGFR, también pueden ser utilizados como anticuerpos específicos para el reconocimiento de CTCs [119].

Además de las diferencias bioquímicas entre las CTCs y las células sanguíneas, también existen diferencias físicas. En general, las líneas celulares que se originan a partir de tumores sólidos tienen células más grandes que las células sanguíneas [120].

Se han utilizado varios aparatos biomecánicos para medir las propiedades mecánicas de las células vivas, resultando que las células tumorales con alto potencial metastásico son más susceptibles a la deformación [121]. S.E. Cross y col. aplicaron microscopía de fuerza atómica (AFM) para medir la rigidez de células cancerosas metastásicas vivas obtenidas de líquido pleural de pacientes con cáncer pulmonar, de mama y pancreático. La rigidez celular de las células cancerosas metastásicas es más del 70% menor que el de las células benignas dentro de la misma muestra de líquido pleural (módulo de Young $0,53 \pm 0,10$ kPa frente a $1,97 \pm 0,07$ kPa) [122].

Además, las células cancerosas contienen péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, que son partículas polarizables. El grupo de Gascoyne aplicó fraccionamiento dielectroforético de flujo de campo (DEP-FFF) para estudiar las propiedades dieléctricas de las células cancerosas y demostró que las capacidades de estas células son significativamente mayores que las de las células sanguíneas.

2.2.2. Las células contribuyen a la supervivencia de las CTCs

Las CTCs son ayudadas por otras células no tumorales durante la fase de escape (Fig. 13 y 14). Observaciones morfológicas de células tumorales detenidas en los capilares han demostrado la estrecha asociación de las células tumorales con plaquetas activadas [123]. Las plaquetas pueden envolver rápidamente las CTCs, protegiéndolas de las fuerzas de cizallamiento. La agregación plaquetaria inducida por las células tumorales promueve la extravasación y adherencia [124], proporcionándoles también una defensa contra el sistema inmunológico. Las plaquetas secretan el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que tiene la capacidad de inactivar a las células NK [125]. La transferencia del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) de plaquetas granulares a CTCs, protege a las CTCs del ataque citotóxico de las células NK [119].

Cada vez hay más evidencias de que, además de las plaquetas, otras muchas células sanguíneas como neutrófilos, monocitos y células T reguladoras (Treg), están asociadas con la metástasis de CTCs en el torrente sanguíneo. Las CTCs, al interactuar con neutrófilos unidos al endotelio en la red vascular, promueven actividades de adhesión y migración a través de diferentes blancos moleculares (IL-8, CAM-1) expandiendo el potencial metastásico [126, 127].

También los monocitos juegan un papel importante en la metástasis. Los monocitos pueden extravasarse y diferenciarse en macrófagos, promover la extravasación de células tumorales, la supervivencia y su diseminación [128].

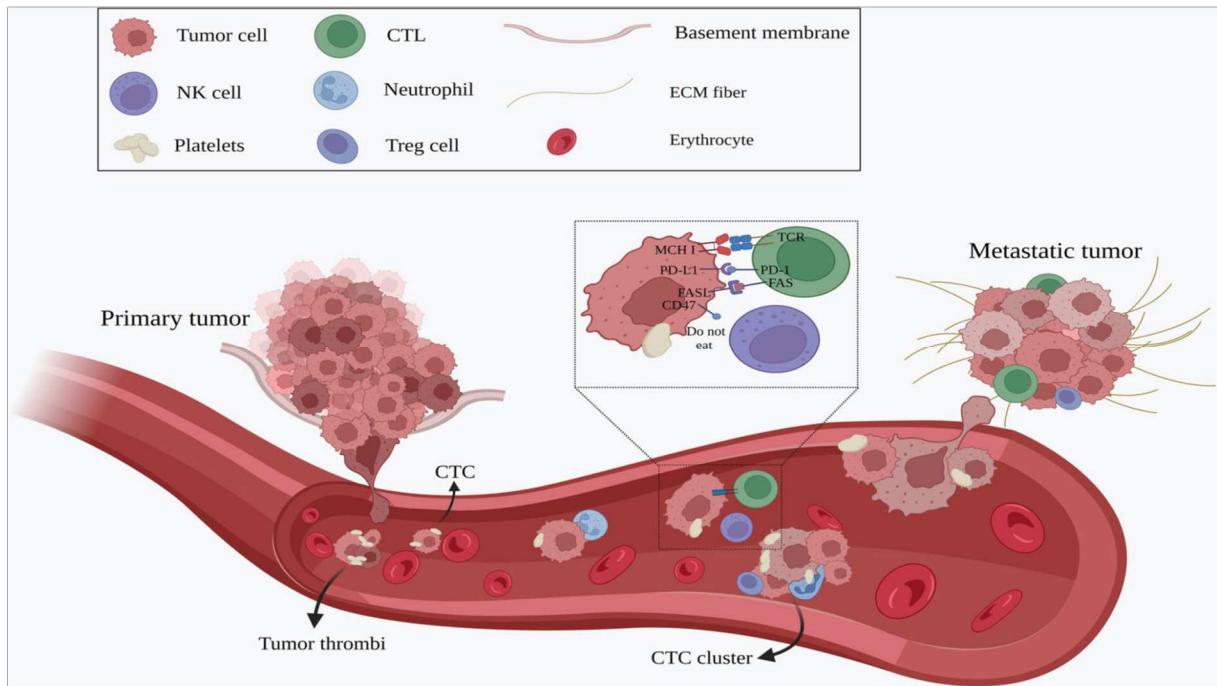


Fig. 13. *Diseminación de células tumorales: 1) invasión localizada; 2) intravasación; 3) supervivencia en circulación; 4) arresto en el lecho capilar; 5) extravasación y migración; 6) estimulación de la angiogénesis. Además de las CTCs individuales, también se encuentran clusters en la sangre del paciente, que tienen un potencial metastásico y una capacidad de supervivencia significativamente mayor. Las CTCs reciben ayuda de las plaquetas y de las células inmunitarias durante la fase de escape [119].*

Las CTCs también se han adaptado para evitar el ataque por parte del sistema inmunitario en el torrente sanguíneo regulando al alza la expresión de FasL en su superficie, reduciendo el umbral de apoptosis en linfocitos T citotóxicos (CTLs) [129]. Además, las CTCs expresan el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1), que representa el mecanismo responsable del escape de la inmunidad [130]. Los investigadores han propuesto que las CTCs positivas para PD-L1 pueden mediar en las células Treg para desempeñar un papel de inmunosupresión. Las células Treg protegen a las CTCs de ser atacadas por el sistema inmunológico, debilitando la capacidad de los CTLs y generando más células mieloides supresoras (MDSCs) [131].

2.2.3. Clusters

Desde la primera observación de CTCs a mediados del siglo XIX por Thomas Arstworth, llevó más de un siglo caracterizarlas mejor. Unos 10 años antes, Virchow había detectado émbolos tumorales atrapados en vasculatura y propuso la primera explicación de la diseminación del cáncer por metástasis. Estos *clusters* se describieron más a fondo a partir de la década de 1950, con un fuerte enfoque en su potencial metastásico

en comparación con las CTCs individuales [132].

Estudios más recientes indican que los *clusters* muestran características distintas en comparación con las CTCs individuales, incluido el fenotipo, la expresión génica y el modo de diseminación. Los *clusters* son grupos de más de dos o tres células tumorales (hasta 100), con fuertes contactos célula-célula, que se detectan en la sangre de pacientes con cáncer. Son muy raros, pero tienen una elevada capacidad metastásica [133].

Los *clusters* representan un conjunto de células tumorales y otros tipos de células, incluidas plaquetas, células inmunitarias y fibroblastos asociados con el cáncer (también se les denomina microémbolos) [134]. Esta mezcla proporciona un microambiente local que los protege de la muerte en la circulación al minimizar el estrés de cizallamiento, el ataque inmunológico y al facilitar la colonización [135].

También se planteó la hipótesis de que el mantenimiento de las uniones célula-célula protege a los *clusters* de la anoikis (muerte celular programada que ocurre en las células dependientes del anclaje cuando se separan de la MEC circundante), causada por la falta de adhesión. Por tanto, los *clusters* pueden tener una ventaja de supervivencia en la circulación y durante la diseminación, pero parece que su período de supervivencia en el torrente sanguíneo es más corto [133].

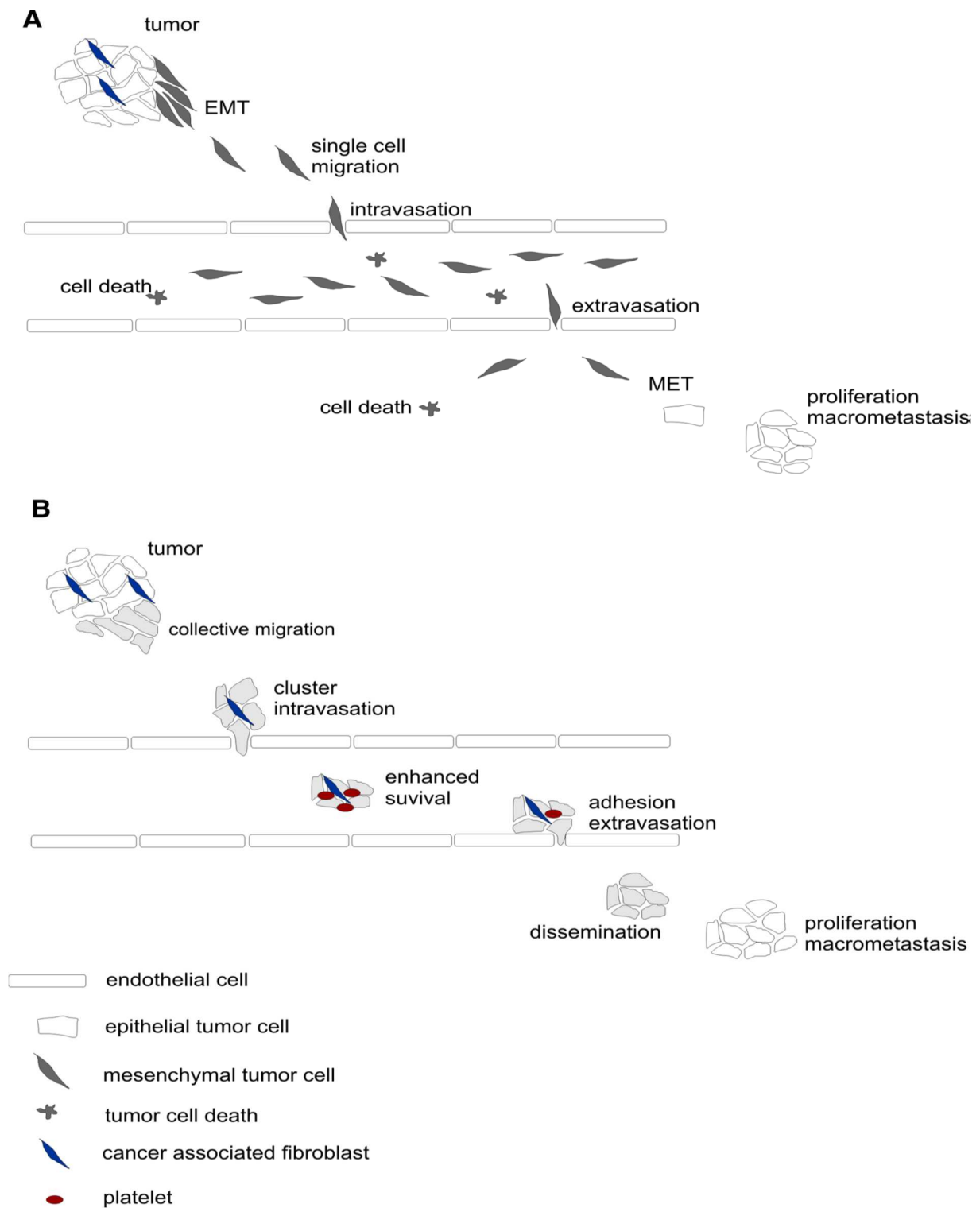


Fig. 14. Dos modos de diseminación de células tumorales. A) El modelo convencional de metástasis del cáncer: las células de un tumor primario se someten a EMT, se vuelven móviles e invasivas, se intravascan y circulan con una baja tasa de supervivencia, además de extravasarse y someterse a MET antes de formar micrometástasis. B) El tumor primario invade los tejidos circundantes en forma de hebras, grupos o clusters de células que migran colectivamente. Los clusters de células tumorales se intravascan en la vasculatura comprometida, y atraen a las células sanguíneas, formando microémbolos con una mayor supervivencia, en comparación con las CTCs individuales. Los grupos se extravascan más rápidamente que las CTCs individuales y colonizan con mayor eficacia [133].

2.3. BIOPSIA LÍQUIDA Y CÁNCER DE PÁNCREAS

Como se ha comentado a lo largo del Capítulo I del presente trabajo, el ADCP es uno de los cánceres más letales, con una baja tasa de supervivencia a 5 años, debido principalmente a su diagnóstico tardío. Se necesitan nuevos biomarcadores tumorales que permitan superar las limitaciones de las biopsias convencionales. Las muestras de BL son útiles para detectar, pronosticar y controlar las respuestas del tumor primario y las enfermedades metastásicas a los tratamientos, facilitando la caracterización de los efectos del tratamiento y la selección de la terapia óptima en función de los cambios en las respuestas terapéuticas.

2.3.1. Aplicaciones clínicas de la biopsia líquida en el cáncer de páncreas

Son muchos los estudios que se han llevado a cabo para determinar las aplicaciones clínicas de la BL en el CP.

Las células de CP están presentes en la circulación de los pacientes antes de que se pueda detectar el tumor. Las células epiteliales circulantes del páncreas (CECs) se encuentran solamente en pacientes con lesiones quísticas y ADCP, y el recuento de éstas es significativamente diferente con respecto a individuos sanos [136]. Las CTCs se encuentran en la mayoría de los pacientes con ADCP en cualquier etapa, ya sea localizado, localmente avanzado o metastásico: pero no se detectan en sangre de individuos sanos [137]. Estos estudios sugieren que las CTCs pueden utilizarse como marcadores en el diagnóstico diferencial y precoz del CP. Además, la combinación de CA 19-9 y CTCs aumenta su detección [138].

A principios de 1998, se descubrió que los cfDNA en el plasma eran diferentes en pacientes con CP frente a controles sanos y tuvieron valor diagnóstico en pacientes con ADCP, por lo que podrían ser útiles en pacientes sin CTCs detectables [111]. Además, la carga total de cfDNA fue mayor en casos de ADCP que en tumores neuroendocrinos o PC, y diferente en casos de tumores en diferentes estadios [139]. Estudios previos también encontraron fragmentos de genes mutados en la sangre de pacientes con cáncer. Zill y col. tras el análisis de 54 genes en pacientes con ADCP encontró que casi el 90% de las mutaciones de estos genes en biopsias tumorales también eran detectables en los cfDNA, lo que sugiere que los cfDNA podrían ser

marcadores potenciales de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad [140].

Los pacientes con cáncer tienen una cantidad significativamente mayor de exosomas totales que los individuos sanos, porque se secretan en grandes cantidades durante la carcinogénesis. En comparación con los cfDNA, las células vivas pueden secretar exosomas, por lo que están presentes en la sangre antes de la necrosis y, por tanto, se pueden detectar en las etapas tempranas, como hemos comentado en apartados anteriores [141]. También se han detectado mutaciones en genes usando ADN genómico de exosomas derivados de líneas celulares de CP y suero de pacientes con CP, lo cual sugiere que los exosomas derivados del suero pueden usarse para determinar mutaciones de ADN genómico para diagnóstico de cáncer. Se trataría entonces de una fuente de ADN tumoral complementaria a otras fuentes de ADN de BL [111].

2.3.2. Respuesta a los tratamientos y evaluación del pronóstico

Numerosos estudios han demostrado que la presencia o ausencia de CTCs puede ser un factor pronóstico y, su positividad antes o después del tratamiento está relacionada con la SG [142, 143]. Por lo tanto, también puede usarse como biomarcadores de respuesta al tratamiento. En pacientes con quimioterapia con fluorouracilo, la tasa de detección de CTCs disminuyó tras el primer ciclo de terapia y en estos pacientes se detectaron CTCs apoptóticas, las cuales podrían usarse para monitorizar la eficacia de la quimioterapia en pacientes con CP [144]. En resumen, la determinación de CTCs (no sólo su número sino también su fenotipo) se puede utilizar como herramienta mínimamente invasiva para predecir pronósticos y respuestas al tratamiento en pacientes con CP [111].

Estudios recientes han determinado que los cfDNA podrían usarse para evaluar la eficacia del tratamiento, así como la progresión de la enfermedad en pacientes con CP. Además, indican menor supervivencia en pacientes resecados o metastásicos cuando se detectan tras la cirugía o la quimioterapia [145, 146]. EL 90% de los pacientes que tenían cfDNA positivo antes de la quimioterapia experimentó una progresión de la enfermedad durante el seguimiento frente al 25% con cfDNA negativo. Niveles altos de cfDNA en plasma se relacionan con SG más baja [147].

Los exosomas tumorales tienen un papel en la supervivencia y crecimiento de las células tumorales y participan en la invasión del tejido del huésped, así como en la posterior metástasis y evasión de la respuesta inmunitaria [111].

2.3.3. Metástasis y recurrencia

Hay estudios que correlacionan la metástasis en pacientes con ADCP con la detección y el aumento de CTCs. La presencia de CTCs en la VP de pacientes sometidos a resección pancreática se relaciona con una mayor tasa de metástasis hepática [148, 149]. Puesto que las CTCs se desprenden del tumor primario y viajan por el torrente sanguíneo, se pueden diseminar a órganos distantes. Es lógico, por tanto, que una diseminación reducida, beneficiará a los pacientes con CP. Sin embargo, un estudio puso de manifiesto que esta reducción no está tan relacionada con la técnica quirúrgica sino con la liberación temprana de CTCs a la sangre a partir del tumor primario [150]. Descubrieron que los pacientes con metástasis oculta tenían un número significativamente mayor de CTCs que aquellos con enfermedad local [151]. El aumento en el número de CTCs después de la cirugía demostró una alta tasa de metástasis. Por tanto, un recuento elevado de CTCs en sangre antes de la cirugía o después de la cirugía puede ser indicativo de una enfermedad metastásica indetectable antes de la cirugía [111].

Una aplicación clínica para los cfDNA es la detección precoz de recaídas después del tratamiento. Estudios recientes han determinado que niveles altos de cfDNA en plasma de pacientes con CP se correlacionan con metástasis y recurrencia. La detección de cfDNA después de la resección supone recaída clínica y malos resultados [147].

Los exosomas pueden funcionar como vehículos de comunicación entre células vecina o a larga distancia, por lo que se ha estudiado su posible participación en la metástasis. Un estudio reciente ha mostrado niveles de exosomas significativamente más altos en pacientes con ADCP en etapa I que luego desarrollaron metástasis en el hígado, en comparación con pacientes con tumores pancreáticos que no progresaron [152].

A pesar de todos estos avances, se requieren aún estudios adicionales para ayudar a desarrollar las aplicaciones clínicas óptimas de la BL para el diagnóstico y tratamiento del CP.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no existen marcadores pronósticos y predictivos que indiquen la presencia de invasión vascular, neural o linfática, lo que dificulta el manejo clínico de los pacientes y, por tanto, su posibilidad de curación. Entre los biomarcadores que podrían evaluarse antes de la operación, las CTCs, como parte de la familia de la BL, podrían ser uno de los marcadores clínicos propuestos.

De aquí que, en el presente trabajo, se hayan evaluado CTCs y *clusters* en pacientes con adenocarcinoma pancreático temprano a partir de muestras de sangre venosa portal y central recolectadas simultáneamente durante pancreaticoduodenectomía (PD).

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

1. HIPÓTESIS NULA

H0: Las CTCs y los *clusters*, como parte de la familia de la biopsia líquida, identificados en sangre periférica y en vena porta en pacientes con cáncer de páncreas, NO son marcadores pronóstico y de supervivencia (metástasis y enfermedad mínima residual).

2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA

H1: Las CTCs y los *clusters*, como parte de la familia de la biopsia líquida, identificados en sangre periférica y en vena porta en pacientes con cáncer de páncreas, son marcadores pronóstico y de supervivencia (metástasis y enfermedad mínima residual).

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

1. GENERALES

- Evaluar los niveles de CTCs y *clusters* en los pacientes con cáncer de páncreas y su posible correlación con el pronóstico de la enfermedad.

2. ESPECÍFICOS

1. Validar una metodología de cuantificación y caracterización de CTCs y *clusters* mediante el algoritmo de la transformado de Hough.
2. Determinar la vía óptima de determinación de CTCs y *clusters* comparando muestras de sangre portal versus central.
3. Valorar la posible correlación de CTCs y *clusters* con los parámetros que definen las características del tumor.
4. Valorar las CTCs y *clusters* como factor pronóstico para la supervivencia global de los enfermos.
5. Valorar la presencia de CTCs y *clusters* como factor pronóstico de recurrencia local o sistémica.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODO

1. **DISEÑO DEL ESTUDIO**

Antes de iniciar el capítulo de material y método propiamente dicho creemos importante hacer un comentario sobre el diseño del estudio (Fig. 15).

Se trata de un estudio prospectivo, longitudinal, en el que se incluyen pacientes con tumores de páncreas y periampulares intervenidos mediante duodenopancreatectomía cefálica (DPC).

- Fase clínica: En este momento comienza la selección de pacientes entre la población de pacientes con tumores de páncreas y periampulares que cumplen criterios de inclusión. Se les ofrece entonces la posibilidad de participación en el estudio y, en caso de aceptar, firman el consentimiento informado. En quirófano, antes de manipular el tumor, se obtienen las muestras de sangre (portal y central).
- Fase analítica: Las muestras de sangre son enviadas al Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), concretamente al laboratorio 209 perteneciente al grupo Cirugía Oncológica, Terapia Celular y Trasplante de Órganos, donde se llevará a cabo el aislamiento, detección y enumeración de CTCs con el sistema Isoflux™.
- Fase de recogida e interpretación de datos: Tras la fase analítica, realizamos la recogida de datos en la base de datos diseñada a tal efecto para su posterior interpretación con la ayuda de CAEBI Bioinformática Sociedad Limitada.

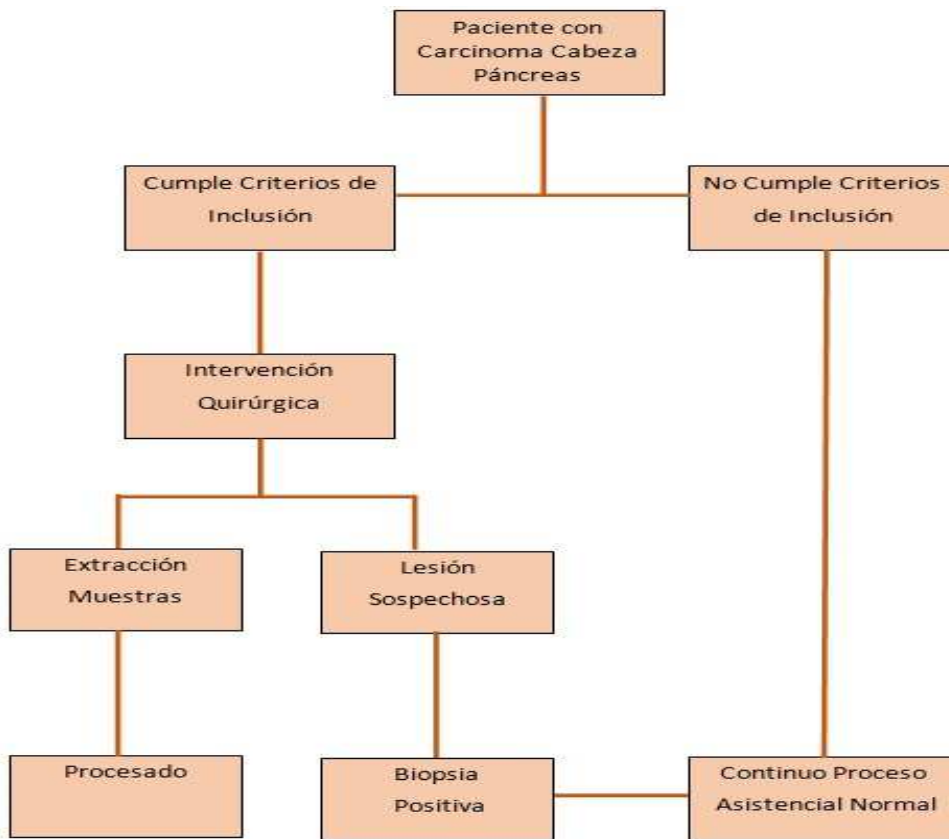


Fig. 15. Esquema del diseño del estudio.

2. PACIENTES

De los 280 pacientes evaluados en el Comité de Tumores del Hospital Universitario Virgen del Rocío durante el período establecido para el reclutamiento de pacientes, en este estudio se valoraron inicialmente 41 pacientes de los cuales, finalmente, 35 pacientes con carcinoma en la cabeza del páncreas se incluyeron en el análisis. El CEI de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío aprobó el protocolo del estudio (Anexo I). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado antes de su participación en él (Anexo II).

El estudio incluyó pacientes potencialmente resecables con estadios I-II-IIIa, según la clasificación TNM de tumores malignos del AJCC [70-72]. Solo los pacientes en los que no se demostró metástasis mediante TC y/o PET fueron intervenidos quirúrgicamente. También se realizaba biopsia ante cualquier lesión sospechosa y, si el análisis intraoperatorio era positivo para adenocarcinoma metastásico, se cancelaba la DP.

2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- El paciente es mayor de 18 años y presenta adenocarcinoma de páncreas y tumores periampulares potencialmente resecables mediante duodenopancreatectomía cefálica o duodenopancreatectomía total indicada intraoperatoriamente por motivos técnicos que acepten voluntariamente participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.

2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

6 de los 41 pacientes valorados inicialmente fueron excluidos del estudio por cumplir alguno de estos criterios de exclusión:

- No firma consentimiento informado.
- Diagnóstico de cáncer metastásico.

- Tumor localmente avanzado irresecable.
- Episodios de pancreatitis en los tres meses previos a la cirugía.
- Antecedentes de cáncer en los últimos cinco años.
- Neoadyuvancia.
- Problemas logísticos para la determinación de las CTCs.

En el siguiente esquema se detalla la selección de pacientes (Fig. 16):

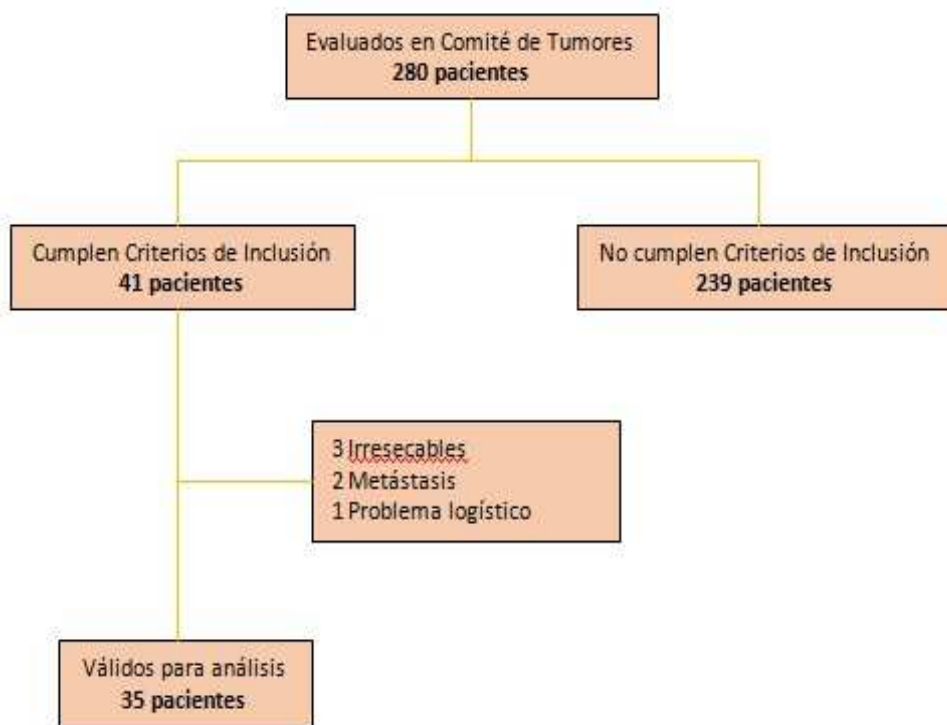


Fig. 16. Flujograma de pacientes.

3. METODOLOGÍA

3.1. DETERMINACIONES REALIZADAS

Las determinaciones realizadas durante el desarrollo del estudio fueron las siguientes:

- Determinaciones analíticas: CA 19-9 (U/ml)
- Tamaño tumoral (cm)
- Estadío:
 - I
 - II
 - III
- Grado de diferenciación:
 - G1: Bien diferenciado
 - G2: Moderadamente diferenciado
 - G3: Pobremente diferenciado
- CTCs libres (nº células/ml)
- *Clusters* (nº *clusters*/ml)
- CTCs dentro de *clusters* (nº células dentro de *clusters*/ml)
- CTCs totales (nº células libres + nº células dentro de *clusters*/ml)
- Invasión:
 - Vascular (Sí/No)
 - Linfática (Sí/No)
 - Neural (Sí/No)
- Tratamiento:
 - Quimioterapia (Sí/No)
 - Radioterapia (Sí/No)

- Supervivencia global
- Supervivencia libre de enfermedad:
 - Recidiva local
 - Metástasis

Todas las determinaciones se registraron tanto en un informe de anatomía patológica (Anexo III) como en un cuaderno de recogida de datos (CRD) (Anexo IV).

3.2. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CTCs Y CLUSTERS

3.2.1. Cultivo celular

Se utilizaron células de CP de la línea celular PANC-1 (ATCC® CRL-1469) en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, BE12-604F, Lonza) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, F7524, Sigma-Aldrich) y penicilina/estreptomicina al 1% (15140122, Gibco). Las células se cultivaron en un incubador humidificado con CO₂ al 5% y 37°C de temperatura. Una vez que se necesitaron las células, los cultivos celulares se lavaron con buffer fosfato salino (PBS, H3BE17-516F, Lonza) y se tripsinizaron con tripsina-EDTA al 0,05% (25300-062, Gibco). Estas células de cáncer de páncreas (CCP) se usaron para calibrar el método del algoritmo de la transformada de Hough.

3.2.2. Preparación de muestras para la recuperación, precisión, sensibilidad y linealidad de la detección de células de cáncer de páncreas

Para llevar a cabo tales experimentos se utilizaron dos grupos diferentes. Se recolectaron siete ml de sangre periférica de donantes sanos (n=3), se procesaron y mezclaron con 100, 300 y 1000 CCP, aproximadamente, como control positivo (primer grupo). Para el segundo grupo, control negativo, se procesaron siete ml de sangre extraída de donantes sanos (n=3). La especificidad de la anti-citoqueratina (CK) se evaluó utilizando la línea celular de tumor pancreático PANC-1 como control positivo dada la alta expresión que presenta de dicha proteína; y la célula mononuclear de sangre periférica (PMBC) como control negativo por su falta de expresión de EpCAM y CK (Fuente: The Human Protein Atlas).

Definimos la recuperación Manual-Isoflux™ como el número de CCP contadas manualmente tras Isoflux™/el número de CCP mezcladas con la muestra y la recuperación por el método Hough-Isoflux™ como el número de CCP contadas por la transformada de Hough tras Isoflux™/el número de CCP mezcladas con la muestra.

La precisión se definió como el número de CCP bien contadas, es decir, comprobadas en la imagen/el número de CCP contadas por transformada de Hough, mientras que la sensibilidad se definió como el número

de CCP bien contadas (comprobadas en la imagen)/ el número de CCP mezcladas con la muestra.

La linealidad hace referencia a la correlación entre el número de CCP mezcladas con la muestra y el número de CCP contadas. Cuanto más próxima a 1 sea R^2 , mejor será la correlación.

3.2.3. Aislamiento y detección de CTCs y clusters

3.2.3.1. Biopsia líquida

Durante la cirugía, antes de manipular el tumor, se obtuvieron simultáneamente siete ml de muestras de sangre de la punta del CVC en la vena cava superior y de la VP por punción directa. Con el fin de descartar las células epiteliales desprendidas por la venopunción (dado que estos pasos pueden causar desprendimiento de células epiteliales no específicas, estos factores pueden afectar la frecuencia de las mismas en la sangre), se desechó la primera fracción de sangre extraída. Ambas muestras se recolectaron en tubos Vacutainer con K2-EDTA, se mantuvieron a temperatura ambiente y se procesaron 24 h después de la recolección. Las muestras de sangre se enriquecieron en células sanguíneas mononucleares periféricas mediante centrifugación en gradiente con Ficoll- Paque PLUS (Sigma-Aldrich®, Ref.GE17-1440-02), y las CTCs se aislaron mediante el sistema IsoFlux™.

El sistema Isoflux™ se ha diseñado para aislar CTCs basándose en un proceso microfluídico de selección positiva inmunomagnética. Este sistema utiliza microesferas que generan un campo magnético capaz de capturar células incluso con una baja expresión de marcadores. Todo el proceso está automatizado, mejorando su capacidad de capturar las CTCs.

El kit de enriquecimiento de CTCs para EMT Isoflux™ (kit de enriquecimiento EMT, Izasa, Ref. N.910-0106) se ha utilizado para el enriquecimiento de CTCs en la muestra. En este kit las perlas se conjugaron con cuatro anticuerpos diferentes, dirigidos tanto a marcadores epiteliales como mesenquimales. El kit utiliza anticuerpos anti-EpCAM y anti-EGFR para la detección de células epiteliales, así como anti-N-cadherina y anti-vimentina como marcadores mesenquimales. La EpCAM es una molécula de la superficie celular que se expresa en la mayoría de los tumores sólidos. Las perlas inmunomagnéticas conjugadas con anticuerpos se

añadieron a las células suspendidas en tampón de unión IsoFlux™ y se incubaron durante 90 min a 4°C, como se indica en el protocolo Fluxion. Posteriormente, se sometieron a aislamiento inmunomagnético con IsoFlux™ (Fluxion Biosciences Inc). Tras su paso por el IsoFlux™, las células enriquecidas se fijaron y tiñeron con reactivos fluorescentes (Isoflux™ Circulating Tumor Cell Enumeration Kit, Izasa, Ref. N.910-0093).

Los reactivos fluorescentes incluidos fueron anti-CK-isotiocianato de fluoresceína (CK-FITC) específicos para la proteína intracelular CK, característica de las células epiteliales; anti-CD45-Indocarbocianina (Cy3) específica para leucocitos; y Hoechst 33342, una contratinción nuclear permeable a las células con tinción de ácido nucleico que emite fluorescencia azul cuando se une a regiones ricas en AT del surco menor en el ADN.

Para la adquisición de las imágenes se utilizó un microscopio de Fluorescencia Directa Olympus BX-61. En base a lo comentado anteriormente, las CTCs se definen como células CK+/CD45-/nucleadas y morfológicamente intactas. Las imágenes obtenidas se procesaron mediante un software de imágenes basado en la transformada de Hough que nos permitió una clasificación de los eventos contados en CTCs, *clusters* y CTCs dentro de *clusters*, así como una caracterización de su tamaño.

A continuación, se describe paso a paso el protocolo de procesamiento de las muestras:

3.2.3.2. Protocolo de enriquecimiento

3.2.3.2.1. Preparación de reactivos

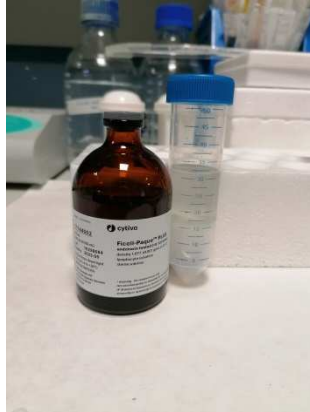
1. Dar un pulso a todos los reactivos y poner en hielo hasta su uso.
2. Con cuidado resuspender las RCE Beads con micropipeta para tener una suspensión uniforme.
3. En un eppendorf de 1,5ml añadir (por muestra): 100µl RCE Beads, 13.2µl EGFR Ab, 3µl EMT Ab1, 0.8µl EMT Ab2 y 3µl EMT Ab3. Cerrar la tapa, poner parafilm e invertir suavemente para mezclar.
4. Active mixing: colocar el imán en el fondo del eppendorf de forma que las beads se acumulen en él, retirar el imán e invertir el eppendorf varias veces para que las beads se resuspendan. Repetir el proceso 10 veces.

5. Incubar el eppendorf en la noria durante 2 horas a temperatura ambiente u overnight a 4°C. Ahora se llaman EMT Beads. Esta preparación (sin lavar) se puede conservar a 4°C durante 4 semanas.
6. Antes de añadir las a la muestra hay que lavarlas y, para ello:
 - Resuspender las EMT Beads con micropipeta para tener una suspensión uniforme y dispensar 100µl/muestra en un eppendorf.
 - Colocar el imán en el fondo durante 15 segundos para que las beads se acumulen, retirar el sobrenadante con el imán en el eppendorf, retirar el imán y añadir 1ml de Binding Buffer (BB).
 - Invertir para mezclar y repetir el proceso de lavado 2 veces más.
 - Después del tercer lavado, retirar el sobrenadante con el eppendorf en el imán y resuspender las beads lavadas en 100µl/muestra de BB.
 - Mantener el hielo hasta su uso.
7. Lavado de CTCs (EpCAM) Beads:
 - Resuspender las CTCs (EpCAM) Beads con micropipeta para tener una suspensión uniforme y dispensar 40µl/muestra en un eppendorf.
 - Colocar el imán en el fondo durante 15 segundos para que las beads se acumulen, retirar el sobrenadante con el eppendorf en el imán, retirar el imán y añadir 100µl de BB.
 - Invertir para mezclar y repetir el proceso de lavado 2 veces más.
 - Después del tercer lavado, retirar el sobrenadante con el eppendorf en el imán y resuspender las beads lavadas en 40µl/muestra de BB.
 - Mantener el hielo hasta su uso.

Antes de empezar preparamos los eppendorf de 1,5ml que vayamos a usar con 1ml de BB y los colocamos en la noria a temperatura ambiente hasta su uso.

3.2.3.2.2. Enriquecimiento de la fracción de células mononucleares

1. Añadir 15,2ml de Ficoll-Paque PLUS al tubo Leucosep de 50ml.

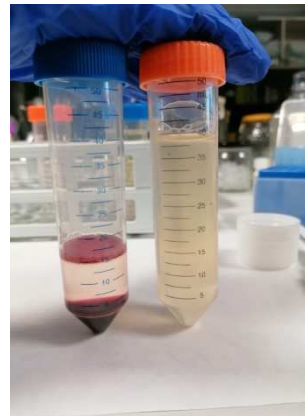


2. Centrifugar a 1000xg durante 30 segundos con el freno puesto a temperatura ambiente.
3. Añadir 5ml de PBS-CMF (buffer fosfato salino sin calcio ni magnesio) al tubo Leucosep.
4. Inmediatamente añadir la sangre dejándola caer por la pared del tubo Leucosep. Lavar los restos de sangre del tubo EDTA con 10ml PBS-CMF y añadir lentamente al tubo Leucosep. Repetir el lavado una vez más.



5. Centrifugar a 800xg durante 15 minutos sin freno a temperatura ambiente. Durante esta centrifugación lavar las CTCs Beads y las EMT Beads y dejarlas en hielo hasta su uso.
6. Retirar el sobrenadante del tubo Leucosep y añadirlo a un falcon de 50ml dejando unos 5-10ml en el tubo Leucosep. Con el volumen que dejamos en el tubo Leucosep lavar las paredes del tubo y,

posteriormente, también los volcamos en el falcon. Terminar de lavar el tubo Leucosep con 10ml PBS-CMF y volcar en el falcon.



7. Centrifugar el falcon de 50ml a 280xg durante 10 min con freno puesto a temperatura ambiente.
8. Retirar el sobrenadante con cuidado de no llevarnos el pellet (no volcar el tubo y no dejar el pellet seco). A medida que nos acerquemos al pellet usamos micropipeta con el objetivo de dejar unos 500 μ l de volumen con el pellet.



9. Añadir 50 μ l de Fc Blocking Reagent al pellet en el falcon. Golpeamos la mesa varias veces para que se levante el pellet (no vórtex). Si se observan acúmulos de células podemos resuspender, para deshacerlos, con hasta 300 μ l de BB.
10. Incubar en hielo 5 min.
11. Coger los eppendorf preparados antes de comenzar el procesamiento de la noria y retirar el BB.
12. Poner la micropipeta a 300 μ l y resuspender el pellet del falcon (cuidado de no formar burbujas). Recoger toda la suspensión y añadirla al eppendorf. Lavar el falcon con 200 μ l de BB y echarlo en el mismo eppendorf. Continuar lavando con BB hasta que no queden restos en el falcon (no tener más de 800 μ l en el eppendorf).

3.2.3.2.3. Conjugación de las beads con la muestra

1. Resuspender con la micropipeta las CTCs Beads lavadas. Añadir 30µl de éstas (lavadas anteriormente en el punto 7 del apartado 3.2.3.2.1) al eppendorf con la suspensión celular.
2. Resuspender con la micropipeta las EMT Beads lavadas. Añadir 90µl de éstas (lavadas anteriormente en el punto 6 del apartado 3.2.3.2.1) al eppendorf con la suspensión celular.
3. Invertir el tubo para mezclar. Active mix (punto 4 del apartado 3.2.3.2.1).



4. Incubar en la noria a 4°C durante 90 min.

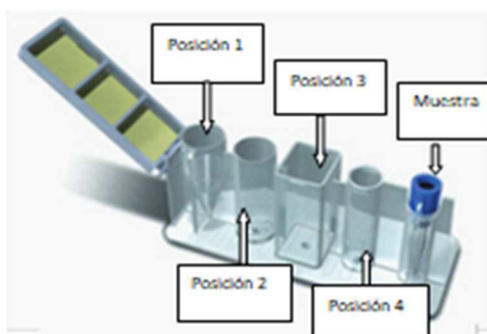


3.2.3.2.4. Aislamiento con IsoFlux™ System

1. Encender el aparato (IsoFlux™ System).



2. Run protocol.
3. Seleccionar número de muestras (se colocan de izquierda a derecha).
4. Abrir el cartucho, quitar el tubo del pocillo 5 y colocar en su lugar el Recovery Holder.
5. Añadir 3ml de BB al pocillo 2, cerrar la tapa y colocarlo en la posición adecuada en el aparato para hacer el Prime.



6. Pulsar Ready to Load Sample.



7. Añadir el contenido de los eppendorf en el pocillo 1 de cada cartucho evitando la formación de burbujas.

8. Pulsar Load, comenzará el aislamiento celular.
9. Una vez completado el aislamiento celular, presionar Extract Sample. Los cartuchos saldrán automáticamente.

3.2.3.2.5. Recuperación de las células aisladas

1. Tener preparados nuevos eppendorf de 1,5ml.
2. Retirar e invertir el Recovery Holder de modo que las células enriquecidas queden hacia arriba.
3. Inmediatamente añadir 50µl de BB, recoger las células y añadir las en el eppendorf preparado en el punto 1.
4. Invertir para mezclar.

3.2.3.3. Protocolo de enumeración

3.2.3.3.1. Preparación de reactivos

Preparar las siguientes soluciones antes de la tinción. Mantener en oscuridad. Realizar el procedimiento de tinción a temperatura ambiente.

- NDS (10%): 5µl de Normal Donkey Serum + 45µl de BB
- CD45 (1:100): 0.5µl de Rabbit Anti Human CD45 + 49.5µl de BB
- Cy3 (1:200): 0.3µl de Donkey Anti Rabbit IgG-Cy3 + 49.75µl de BB
- Perm Buffer (0.2% TX-100): 10µl 10% TX-100 + 490µl de BB
- CK-FITC (1:10): 0.8µl Mouse Anti Human Cytokeratin-FITC + 5µl Perm Buffer + 40µl de BB
- Wash+H Buffer (1x Hoechst 0.02% TX-100): 1µl 1000X Hoechst + 100µl Perm Buffer + 900µl de BB

3.2.3.3.2. Tinción y visualización de las células

1. Después del aislamiento de CTCs con IsoFlux™ System, recuperar y transferir las células/beads a un eppendorf con BB. Con el imán en el fondo, retirar y descartar el buffer.
2. Retirar el imán y añadir 40µl de Fix (1:1) Solution dejándolo caer por la pared del eppendorf. Dispersar suavemente las células/beads, no pipetear.
3. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar la Fix (1:1) Solution con el imán en el fondo del eppendorf, retirar el imán y añadir 100µl de BB a las células/beads. Usar brevemente el imán para mezclar las células/beads. La muestra se puede conservar a 4°C hasta 14 días.

Partimos de muestras fijadas a 4°C (con BB). A partir de aquí trabajaremos en oscuridad.

5. Colocar el imán en el fondo del eppendorf, descartar el sobrenadante, retirar el imán y añadir 40µl de NDS (10%). Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Colocar el imán en el fondo del eppendorf, descartar el sobrenadante, retirar el imán y añadir 40µl de CD45 (1:100). Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, con mezcla ocasional.
7. Colocar el imán en el fondo del eppendorf, descartar el sobrenadante, retirar el imán y lavar con 100µl de BB.
8. Colocar el imán en el fondo del eppendorf, descartar el sobrenadante, retirar el imán y añadir 40µl de Cy3 (1:200). Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, con mezcla ocasional.
9. Colocar el imán en el fondo del eppendorf, descartar el sobrenadante, retirar el imán y lavar con 100µl de BB.
10. Colocar el imán en el fondo del eppendorf, descartar el sobrenadante, retirar el imán y permeabilizar las células con 40µl de Perm Buffer (0.2% TX-100) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Colocar el imán en el fondo del eppendorf, descartar el sobrenadante, retirar el imán y añadir 40µl de CK-FITC (1:10) durante 40-60 minutos a temperatura ambiente, con mezcla ocasional.

12. En este tiempo preparar los portaobjetos. Con la plantilla y el rotulador hidrofóbico hacemos el cuadrado que delimita la superficie y con lápiz rotular el portaobjetos.
13. Colocar el imán en el fondo del eppendorf, descartar el sobrenadante, retirar el imán y lavar con 100µl de Wash+H Buffer (1x Hoechst, 0.02% TX-100).
14. Con el imán descartar el sobrenadante, retirar el imán y añadir 100µl de BB.
15. Colocar el portaobjetos correspondiente en la gradilla, y el centro del cuadrado justo encima del imán pequeño (tallo).
16. Coger todo el contenido del eppendorf y transferirlo dentro del cuadrado.
17. Con la micropipeta retirar todo el sobrenadante del cuadrado, con cuidado de no llevarnos la muestra.
18. Añadir 5µl de medio de montaje en una esquina del cuadrado. Retirar el portaobjetos del imán y extender el medio de montaje por toda la superficie moviendo el portaobjetos para que la muestra se reparta de manera homogénea.
19. Colocar el cubreobjetos. No quitar las burbujas de aire presionando con fuerza, sólo presionar a toquitos para evitar que las bolas se salgan del cuadrado delimitado.
20. Con el pintañas transparente pintar los extremos del cubreobjetos para que no se mueva.
21. Guardar en posición horizontal a 4°C en oscuridad hasta 2 semanas.

3.2.4. Método de enumeración de CTCs y clusters. Algoritmo de Hough

El paso final en los sistemas de separación inmunomagnética es manual, ya que un técnico debe revisar cada imagen generada para determinar si cada uno de los eventos contados es Hoechst 33342+/CK+/CD45- [153].

Además, es muy importante que estos métodos permitan la detección de un grupo de CTCs de más de dos o tres células tumorales en la sangre de un paciente con cáncer que se denominan *clusters* [153-155].

Descrita en 1972, la transformada de Hough es una técnica para identificar formas en imágenes. La transformada de Hough es un algoritmo que detecta líneas rectas y curvas en una imagen de manera efectiva

y es muy utilizada en procesos informáticos. Diferentes estudios han utilizado con éxito la transformada de Hough para delimitar el borde de las células [156-158]. La transformada de Hough se basa en una teoría matemática sólida que se ha aplicado ampliamente en muchos campos, áreas de estudio tales como detección de línea de carril [159], medición de la altura de un árbol [160], conteo de glóbulos rojos [157, 161], identificación y conteo de conos en la retina humana [156] o la detección y segmentación de estructuras anatómicas en imágenes médicas ruidosas, como cabezas femorales [162].

3.2.4.1. Pre-procesamiento de imágenes

Las imágenes tomadas de muestras teñidas con Hoechst 33342, CK y CD45 son el punto de partida para el análisis con este método. Las imágenes fueron obtenidas a partir del aislamiento en muestras de donantes sanos y pacientes con cáncer. Usamos el canal azul (Hoechst 33342), el canal verde (CK) y el canal rojo (CD45). Cada pista se convirtió a escala de grises eliminando el componente de matiz y saturación y conservando la luminancia.

3.2.4.2. Segmentación de imágenes

Las imágenes se convirtieron a formato binario utilizando el umbral de Otsu global para minimizar la variación dentro de cada grupo. Los píxeles con un valor de escala de grises mayor que el valor calculado por el algoritmo de Otsu se marcaron como uno, mientras que los que no superaban el umbral se marcaron como cero. Además, visualizando el histograma de la imagen, podemos elegir el umbral si el umbral de Otsu no es lo suficientemente alto. Como se describió anteriormente, las CTCs son células CK+/CD45-/nucleadas. Por lo tanto, los píxeles de imagen que muestran Hoechst 33342+, CK+ y CD45- se pueden considerar CTCs. Se aplicó a las imágenes una multiplicación lógica entre las máscaras binarias de los canales azul y verde (Hoechst 33342 y CK, respectivamente). Finalmente, eliminamos los píxeles de umbral del canal rojo (CD45). El objetivo es cuantificar los componentes teñidos de azul y verde pero no de rojo. Los artefactos de la máscara obtenida se eliminaron utilizando funciones de Matlab (como `imcrop` o `roipoly`, donde el usuario puede seleccionar un

componente para eliminar). Teniendo en cuenta que la resolución de las imágenes fue de 0,75 pixel/ μm y que en pacientes con adenocarcinoma de páncreas no está definido el tamaño de las CTCs, se consideró entre 5 y 25 μm , según estudios en otros tumores [163]. Se filtraron los componentes de la imagen para un tamaño entre 10 y 400 píxeles. Si el tamaño del componente supera los 400 píxeles, el componente se introduce en una nueva máscara, donde se contabilizarán como *cluster* y el número de CTCs que hay en su interior. Otro filtro es la circularidad, que debe ser mayor a 0,6; si es menor a ese valor, los componentes se pasan a la máscara de *cluster* para su cuantificación (Fig. 17).

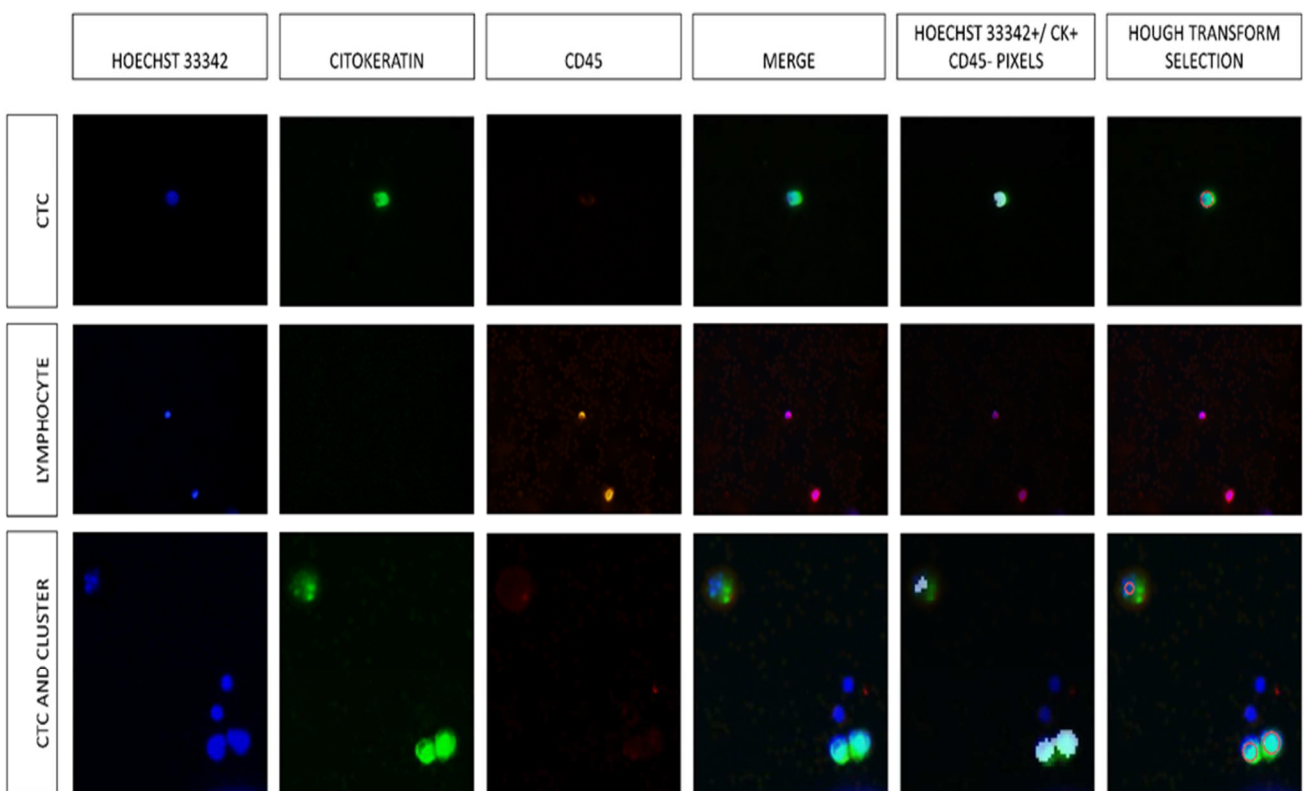


Fig. 17. La fila uno muestra la tinción de CTCs caracterizada por Hoechst 33342+/CK+/CD45-. La quinta imagen de la primera fila muestra la selección de píxeles con tinción de CTCs, y la última foto muestra una CTC rodeada por una circunferencia roja contada por la transformada de Hough. La fila dos muestra la tinción de algunos linfocitos. La fila tres muestra una CTC libre y un cluster que consta de dos CTCs. Las columnas cinco y seis muestran que el algoritmo de transformada de Hough no contó las CTCs si el elemento no tenía tinción con CK.

3.2.4.3. Post-procesamiento de imágenes

Multiplicamos las máscaras obtenidas con la escala de grises del canal verde para facilitar el conteo del algoritmo a través de las intensidades de CK. Finalmente, usando la transformada de Hough a través de la función de Matlab `imfindcircles`, medimos los componentes en la máscara de CTCs y la máscara de *clusters*.

Esta función devuelve el píxel donde se encuentra el centro y el tamaño del evento contado. Si un componente tiene asociado solo el centro de una circunferencia de la transformada de Hough, se contabiliza como una CTC libre, mientras que, si alguno de los componentes tuviera dos o más píxeles como centro de una circunferencia de la transformada de Hough, se cuantifica como un *cluster* con tantas células como centros se hayan contado. El software determinó el número de CTCs libres, *clusters*, CTCs dentro de *clusters* y CTCs totales (CTCs libres más CTCs dentro de *clusters*). El software mostró el tamaño del radio de las CTCs libres y las CTCs dentro de *clusters*. Al mismo tiempo, la superficie del *cluster* se midió por el número de píxeles y la resolución de la imagen. Se proporcionó un análisis del coeficiente de variación intraensayo (CV) de la medición. Así, los valores medios de CV fueron $0,42\% \pm 0,33$ en las CTCs totales; $0,30\% \pm 0,37$ en CTCs libres; $0,72\% \pm 1,25$ en *clusters*, y finalmente $1,41\% \pm 1,22$ en las CTCs dentro de *clusters*.

4. VARIABLES

Las variables consideradas son:

1. Determinadas en los pacientes: CA 19-9, características del tumor, anatomía patológica...)
2. Niveles de CTCs: se determinarán los niveles de CTCs en una extracción basal (antes de la cirugía), de sangre central y portal, realizada a 35 pacientes con tumores de páncreas o periampulares sometidos a DPC. Las CTCs se determinarán en tres formas: CTCs libres (nº CTCs/ml sangre), *clusters* (*clusters*/ml sangre) y CTCs dentro de *clusters* (CTCs dentro *clusters*/ml sangre).
3. Supervivencia (meses): a 12 meses y 24 meses.
4. Metástasis a distancia (%): detección de metástasis hepáticas, pulmonares, cerebrales.
5. Recidivas locales (%): identificación de lesión sugestiva en el área quirúrgica. Para el estudio de la recidiva local se tendrá en cuenta el resultado oncológico del estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica (tasas de R0-R1):
 - R0: La tasa de R0 se define como la no afectación de ninguno de los márgenes de resección siendo la distancia mínima entre el tumor y el borde de resección de al menos 1 mm.
 - R1: En caso de identificar microscópicamente tumor directamente en alguno de los márgenes de resección o existir tumor a una distancia inferior a 1 mm se considerará R1.
6. Tiempo libre de enfermedad (meses): tiempo entre la cirugía y la aparición de recidiva local o metástasis a distancia.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se realizó un análisis de regresión simple para evaluar la linealidad de las dos muestras de sangre para detectar CTCs. La correlación de los recuentos de CTCs y la invasión tumoral (vascular, linfática y neural) se analizó mediante la prueba U de Mann-Whitney y la prueba H de Kruskal-Wallis. La distribución de pacientes por encima y por debajo del punto de corte en CTCs se comparó mediante la prueba exacta de Fisher. El coeficiente de correlación de rangos de Spearman examinó la relación entre los recuentos de CTCs y el marcador tumoral (CA 19-9). Los análisis de supervivencia se realizaron utilizando el límite de producto de Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico. El análisis multivariante se realizó utilizando un modelo de riesgos proporcionales de Cox para evaluar las variables pronósticas independientes. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con IBM Corp. publicado en 2020, IBM SPSS Statistics para Windows, versión 27.0. Armonk, NY, IBM Corp. La significancia requerida fue $p < 0,05$.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO DE ESTUDIO

De los 35 pacientes que se analizaron finalmente, 22 eran hombres y 13 mujeres, con una edad media de $66,9 \pm 9,3$ años y un valor medio de CA 19-9 de $251,7 \pm 553,8$ U/ml. La **resección completa** (R0), según el protocolo establecido [164, 165], se consiguió en 29 pacientes (82,9%). Según su **grado de diferenciación**, los tumores se dividieron en tres grados: bien diferenciados (G1) en 8 pacientes (22,9%), moderadamente diferenciados (G2) en 20 pacientes (57,1%) y poco diferenciados (G3) en 7 pacientes (20%). En cuanto al **estadio tumoral**, hubo 13 pacientes (37,1%) con estadio I, 12 pacientes (34,3%) con estadio II y 10 pacientes (28,6%) con estadio IIIa. Se observó **invasión vascular** microscópica en 12 pacientes (34%), **invasión linfática** en 9 pacientes (26%) e **invasión neural** en 19 pacientes (54%). Con respecto al **tratamiento**, 26 de los pacientes (74,3%) recibieron quimioterapia adyuvante, 2 de los cuales (7,7%) la combinaron con radioterapia. La mayoría de ellos recibieron gemcitabina. Los datos comentados se detallan en una tabla a continuación (Tabla 2) mientras que los resultados relativos a CTCs, *clusters*, invasión y supervivencia se expondrán en posteriores apartados.

Tabla 2. Características de las muestra analizadas en el estudio.

Variable	
Sexo:	
Hombre	22
Mujer	13
Edad	m= $66,9 \pm 9,3$ años
CA 19-9	m= $251,7 \pm 553,8$ U/ml
Resección:	
R0	29 (82,9%)
R1	6 (17,1%)
Grado de diferenciación:	
G1	8 (22,9%)
G2	20 (57,1%)
G3	7 (20%)
Estadio:	
I	13 (37,1%)
II	12 (34,3%)
IIIa	10 (28,6%)
Invasión:	
Vascular	12 (34%)
Linfática	9 (26%)
Neural	19 (54%)
Tratamiento:	
Quimioterapia	26 (74,3%)
Radioterapia	2 (5,7% del total)

2. VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CTCs MEDIANTE EL ALGORITMO DE HOUGH

Previo al estudio de las CTCs propiamente dicho, se realizaron análisis experimentales para la validación del método empleado para su detección y cuantificación en los que se incluyeron líneas celulares tumorales (CCP) y donantes sanos, como controles positivos y negativos, respectivamente. Con respecto a la sensibilidad y precisión de la detección de CCP, las medianas para detectar CCP en los eventos contados fueron 89,00% [82,50-91,00] y 91,00% [84,50-93,50], respectivamente. En muestras de pacientes sanos, que se tomaron como controles negativos (no se mezclaron con CCP), solo se detectó 1 [0-4] linfocito (Fig. 17).

2.1. EVALUACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para las células contadas en los grupos controles (positivos y negativos) así como las tasas de recuperación para los controles positivos por ambos métodos, Manual-Isoflux™ y Hough-Isoflux™. La tasa de recuperación obtenida con el método Hough-Isoflux™ fue similar a la del método Manual-Isoflux™, no habiendo diferencias significativas entre ambos métodos (80,75 ± 13,49 % vs. 82,37 ± 5,77%; p=0,654).

Tabla 3. CCP contadas con los métodos Manual-Isoflux™ y Hough- Isoflux™. Los datos se presentan como media y desviación estándar.

CCP	Células contadas (nº)			Tasa de recuperación controles (%)		
	Manual-Isoflux™	Hough-Isoflux™	p	Manual-Isoflux™	Hough-Isoflux™	p
Sin CCP	3,67 ± 2,60	6,40 ± 4,34	0,263	-	-	-
100 CCP	105,33 ± 8,39	98,00 ± 25,98	1,000	89,92 ± 10,98	88,43 ± 22,75	0,924
300 CCP	302,67 ± 69,97	291,00 ± 68,51	0,847	84,04 ± 2,83	86,17 ± 11,45	0,782
1000 CCP	811,00 ± 86,00	753,00 ± 129,00	0,552	73,16 ± 3,50	67,66 ± 6,29	0,256

Los coeficientes de correlación observados entre las CCP en muestras control en ambos métodos fueron muy similares. En el Manual-Isoflux™ obtuvimos un coeficiente de correlación de $R^2=0,988$ (Fig. 18a), en el método Hough-Isoflux™ el coeficiente de correlación fue $R^2=0,974$ (Fig. 18b), observándose una alta correlación entre ambos métodos con un $R^2=0,991$ (Fig. 18c).

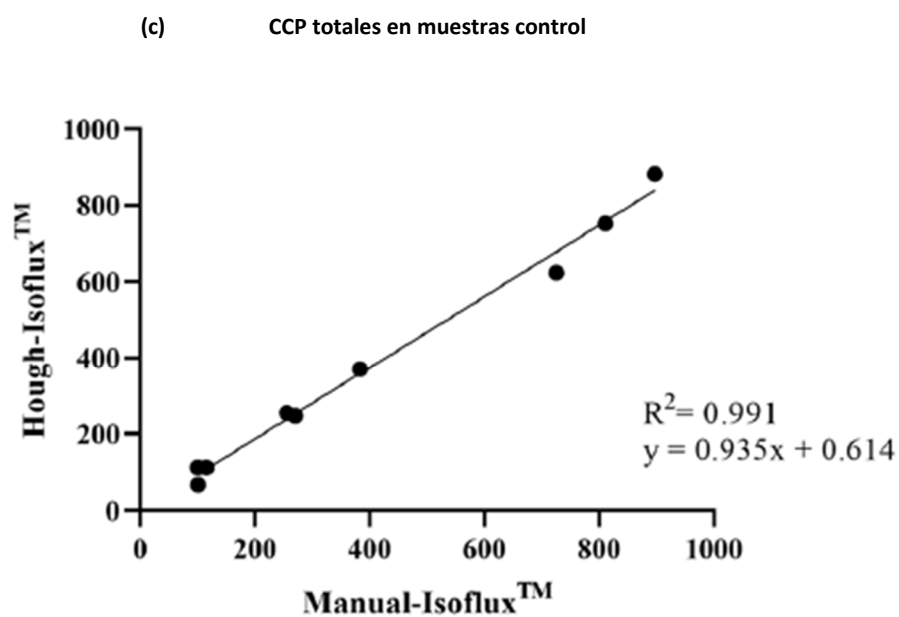
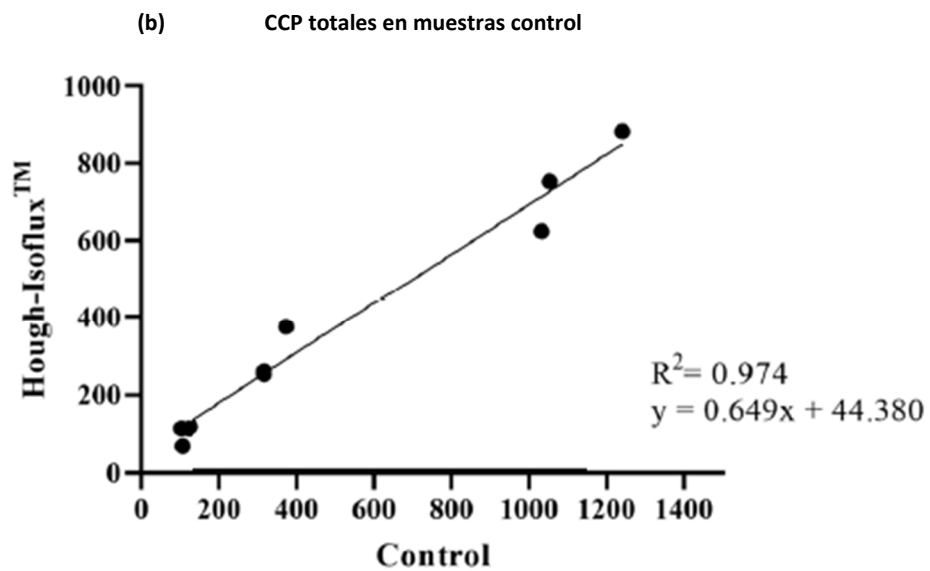
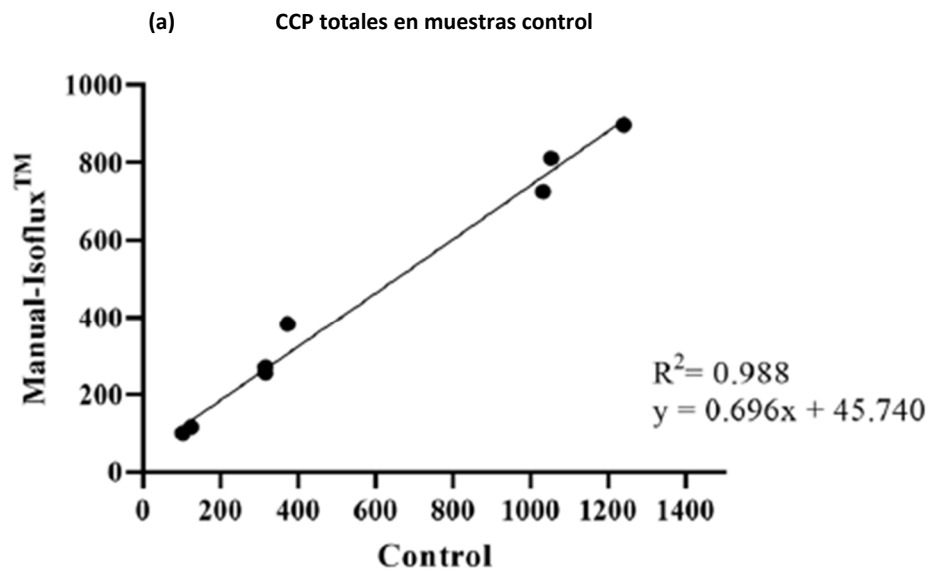


Fig.18. (a). Correlación de CCP totales en muestra control por método Manual-Isoflux™. (b). Correlación de CCP totales en muestra control por método Hough-Isoflux™. (c) Correlación entre ambos métodos, Manual-Isoflux™ y Hough-Isoflux™.

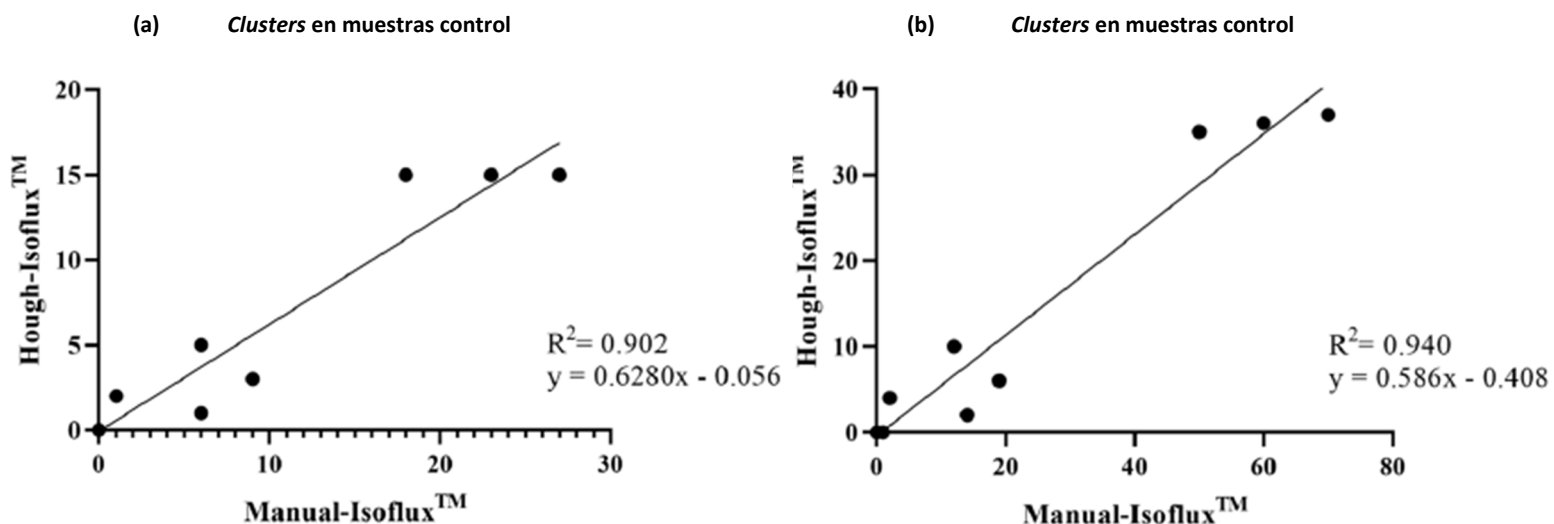
2.2. EVALUACIÓN DE LA DETECCIÓN DE CLUSTERS

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para el recuento de *clusters* y CTCs dentro de *clusters*. En los controles negativos no se encontraron *clusters*. Se observan diferencias significativas en la detección de *clusters* en las muestras con alta concentración de CCP (1000 CCP) y en la detección de CCP dentro de *clusters* en muestras con concentración media-alta de CCP (300-1000 CCP).

Tabla 4. Clusters y CCP dentro de clusters contadas con los métodos Manual-Isoflux™ y Hough-Isoflux™. Los datos se presentan como media y desviación estándar.

CCP	Clusters (nº)			CCP dentro de clusters (nº)		
	Manual-Isoflux™	Hough-Isoflux™	p	Manual-Isoflux™	Hough-Isoflux™	p
Sin CCP	0	0	-	0	0	-
100 CCP	0,33 ± 0,58	0,67 ± 1,15	1,000	0,67 ± 1,15	1,33 ± 2,31	1,000
300 CCP	7,00 ± 1,73	3,00 ± 2,00	0,100	15,00 ± 3,61	6,00 ± 4,00	0,044
1000 CCP	22,67 ± 4,51	15,00 ± 0,00	0,042	60,00 ± 10,00	36,00 ± 1,00	0,014

Los coeficientes de correlación entre ambos métodos fueron similares, tanto en *clusters* como en CCP dentro de *clusters* en las muestras control, siendo $R^2=0,902$ (Fig. 19a) y $R^2=0,940$ (Fig. 19b), respectivamente.



2.3. EVALUACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE CTCs Y CLUSTERS

El método Hough-Isoflux™, además, permite medir el tamaño de CTCs y *clusters*. En las muestras control, el diámetro de las CCP libres fue de $7,71 \pm 0,50 \mu\text{m}$, mientras que el de los *clusters* fue de $11,06 \pm 1,17 \mu\text{m}$. El tamaño de los *clusters* fue de $383,36 \pm 65,59 \mu\text{m}^2$.

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DE CTCs Y CLUSTERS EN FUNCIÓN DE LA VÍA DE ACCESO

El objetivo de este apartado es valorar si la determinación en sangre portal aporta una mayor información sobre las características del tumor que si se mide a nivel central, una vez pasado el filtro hepático.

3.1. CORRELACIÓN ENTRE CTCs Y CLUSTERS EN SANGRE PORTAL (VP) Y CENTRAL (CVC)

Se detectaron CTCs individuales y *clusters* en todos los pacientes, tanto en VP como en CVC (Fig. 20).

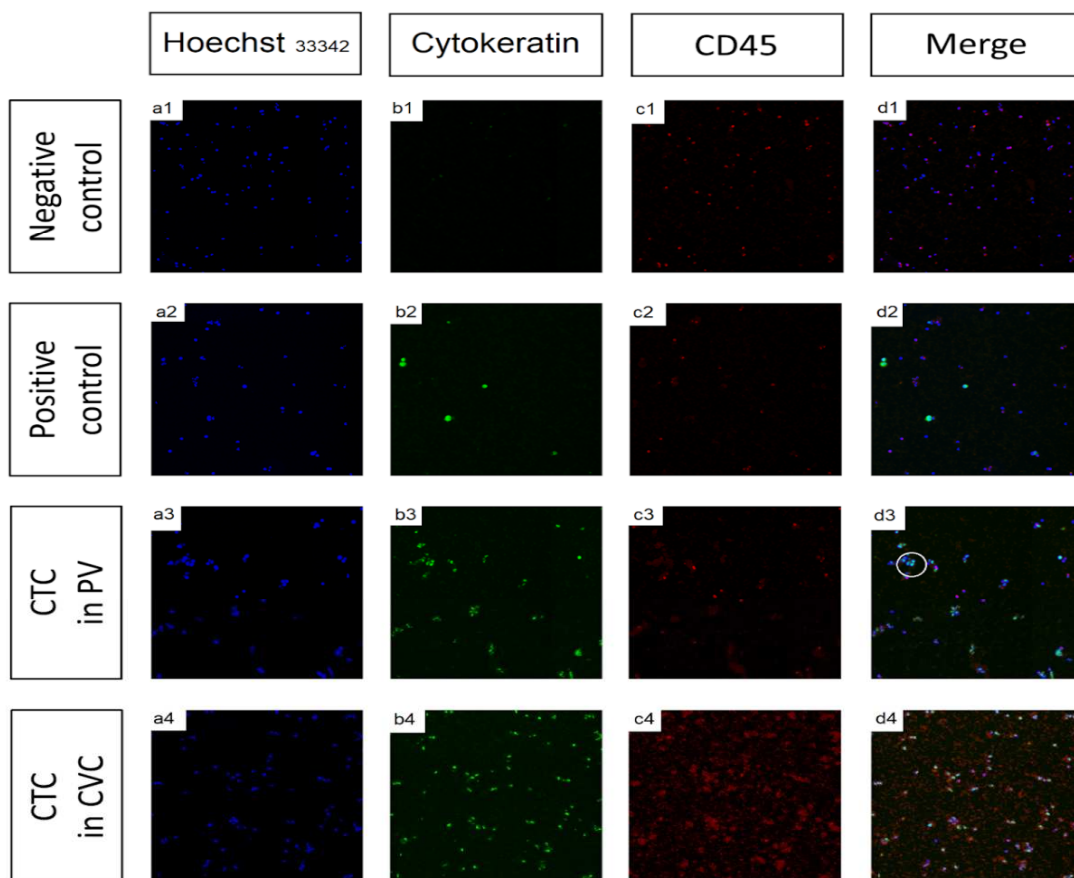


Fig. 20. Imágenes de microscopía de epifluorescencia. La detección y enumeración de CTCs se realizó mediante microscopía de fluorescencia, y las imágenes obtenidas se procesaron mediante un software de imágenes basado en la transformada de Hough. Las CTCs aisladas se tiñeron con: a) CK- FITC específico para la proteína intracelular CK (característica de las células epiteliales) (verde); b) Cy3 específico para leucocitos (rojo); c) Hoechst 33342, utilizado para tinción nuclear (azul); y d) Imagen fusionada sujeta a operaciones lógicas donde realizamos una multiplicación lógica entre las máscaras binarias de los canales azul (nuclear) y verde (CK). Finalmente, eliminamos los píxeles del umbral del canal rojo (CD45). Eliminamos artefactos de la máscara resultante utilizando herramientas de Matlab. El círculo blanco en d3 muestra la imagen de CTCs, que son CK+/CD45-/Hoechst 33342+. Las filas corresponden a: (1) control negativo (PMBC), (2) control positivo (línea celular PANC-1), (3) CTCs detectadas en VP y (4) CTCs detectadas en CVC.

En la Tabla 5 se muestra la correlación en los valores de CTCs entre VP vs. CVC. El coeficiente de correlación de Pearson entre VP y CVC tuvo un valor de $r=0,6$ en las tres mediciones. A pesar de que se detectaron más CTCs, clusters y CTCs totales en CVC que en VP, las diferencias no son estadísticamente significativas y existe una buena correlación dentro de cada variable.

El ratio y el tamaño son datos meramente informativos utilizados como control de calidad entre ensayos, que no deberían diferir entre las muestras.

Tabla 5. Caracterización de CTCs mediante el método de transformada de Hough.

Variable	Portal (mediana, rango)	Central (mediana, rango)	U-mann whitney <i>p</i>	Correlación	<i>p</i>
CTCs libres (células/ml)	235,4 [101,3–375,3]	291,8 [120,0–500,0]	0,151	0,6	0,004
Clusters/ml	12,9 [4,8–33,0]	14,5 [3,8–35,5]	0,622	0,6	0,001
CTCs dentro de clusters	30,4 [12,5–89,4]	37,4 [11,3–89,5]	0,205	0,5	0,008
CTCs totales (células/ml)	310,0 [132,1–446,0]	405,7 [130,7–553,8]	0,239	0,6	0,001
Ratio CTCs libres/CTCs dentro de clusters	2,6 [2,4–3,0]	2,5 [2,3–2,9]	0,051	0,2	0,306
Tamaño medio CTCs libres	7,5 [6,8–8,7]	7,8 [6,7–9,0]	0,981	0,3	0,229
Tamaño medio CTCs dentro de clusters	10,2 [8,5–11,6]	10,3 [8,6–11,7]	0,990	0,3	0,074

3.2. CORRELACIÓN ENTRE CTCs Y CLUSTERS EN SANGRE PORTAL (VP) Y CENTRAL (CVC) SEGÚN GRADO DE DIFERENCIACIÓN

Cuando se compararon los datos obtenidos en función del grado tumoral, los valores alcanzados para un mismo grado fueron algo mayores en CVC que en VP, si bien estas diferencias no fueron significativas (Tablas 6 y 7). Al comparar los grados tumorales en la misma vía de acceso, para ambas muestras, el número de CTCs

dentro de *clusters* es mucho mayor en G3 que en G1/G2, a pesar de no tener diferencias significativas.

El ratio y el tamaño no tienen variación como se esperaba.

Tabla 6. Correlación de CTCs y clusters según el grado de diferenciación tumoral en CVC.

Variable	G1 / G2	G3	p
CTCs libres (células/ml)	279,2 [120,3–482,3]	357,0 [182,5–1020,8]	0,483
Clusters/ml	14,0 [3,3–31,7]	41,0 [17,9–46,8]	0,107
CTCs dentro de clusters	36,7 [8,7–73,7]	97,3 [54,5–116,3]	0,071
CTCs totales (células/ml)	399,0 [129,0–538,5]	481,0 [243,0–1117,7]	0,318
Ratio CTCs libres/CTCs dentro de clusters	2,6 [2,4–2,9]	2,4 [2,2–3,1]	0,483
Tamaño medio CTCs libres	7,8 [6,6–9,1]	8,6 [6,7–10,2]	0,521
Tamaño medio CTCs dentro de clusters	10,3 [8,7–11,6]	10,6 [7,8–13,2]	0,908

Tabla 7. Correlación de CTCs y clusters según el grado de diferenciación tumoral en VP.

Variable	G1 / G2	G3	p
CTCs libres (células/ml)	240,3 [102,2–373,3]	227,0 [140,8–559,0]	0,841
Clusters/ml	10,5 [4,3–32,7]	7,5 [30,0–80,3]	0,310
CTCs dentro de clusters	29,7 [9,2–74,2]	78,5 [21,3–260,6]	0,201
CTCs totales (células/ml)	314,5 [133,0–406,7]	305,5 [162,1–819,6]	0,725
Ratio CTCs libres/CTCs dentro de clusters	2,6 [2,3–2,9]	2,8 [2,6–3,9]	0,150
Tamaño medio CTCs libres	7,3 [6,5–8,5]	8,5 [7,0–9,6]	0,310
Tamaño medio CTCs dentro de clusters	9,7 [8,1–11,5]	10,2 [9,5–12,4]	0,335

3.3. CORRELACIÓN ENTRE CTCs Y CLUSTERS EN SANGRE PORTAL (VP) Y CENTRAL (CVC) SEGÚN TAMAÑO Y NIVELES DE CA 19-9

Se analizaron los niveles preoperatorios de CA 19-9 y el tamaño del tumor por TC y se correlacionaron con CTCs y *clusters*. En ambas muestras, CVC y VP, no encontramos correlación significativa (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Tamaño del tumor y CA 19-9 preoperatorio evaluados según características de CTCs con coeficiente de correlación de Spearman (Rho) en CVC.

Variable	CA 19-9 (Rho)	Tamaño tumor por TC en cm (Rho)
CTCs libres (células/ml)	0,5	0,1
<i>Clusters</i> /ml	0,2	-0,1
CTCs dentro de <i>clusters</i>	0,2	-0,1
CTCs totales (células/ml)	0,4	0,4
Ratio CTCs libres/CTCs dentro de <i>clusters</i>	-0,3	-0,3
Tamaño medio CTCs libres	-0,5	-0,1
Tamaño medio CTCs dentro de <i>clusters</i>	-0,6	-0,6

Tabla 9. Tamaño del tumor y CA 19-9 preoperatorio evaluados según características de CTCs con coeficiente de correlación de Spearman (Rho) en VP.

Variable	CA 19-9 (Rho)	Tamaño tumor por TC en cm (Rho)
CTCs libres (células/ml)	0,4	0,3
<i>Clusters</i> /ml	0,3	0,3
CTCs dentro de <i>clusters</i>	0,3	-0,1
CTCs totales (células/ml)	0,4	0,4
Ratio CTCs libres/CTCs dentro de <i>clusters</i>	0	0
Tamaño medio CTCs libres	-0,1	-0,1
Tamaño medio CTCs dentro de <i>clusters</i>	-0,2	0

3.4. CORRELACIÓN ENTRE CTCs Y CLUSTERS EN SANGRE PORTAL (VP) Y CENTRAL (CVC) SEGÚN INVASIÓN MICROSCÓPICA

Otros factores relacionados con la supervivencia son la invasión neural, vascular y linfática (Tablas 10 y 11). No hubo correlación significativa entre las mediciones de CTCs y la invasión neural, vascular o linfática. Sin embargo, se observa un elevado número de CTCs (libres y totales) en muestras de VP en pacientes con invasión vascular respecto a los que no la tienen.

Tabla 10. Correlación de CTCs y clusters con invasión microscópica en CVC.

Variable	CTCs libres (células/ml)	<i>p</i>	Clusters/ml	<i>p</i>	CTCs totales (células/ml)	<i>p</i>
Invasión vascular	304,9 [151,6–656,4]	0,662	12,1 [3,1–29,5]	0,368	421,8 [162,7–697,9]	0,692
No invasión vascular	291,8 [116,1–480,9]		26,6 [4,3–41,0]		384,4 [123,3–522,5]	
Invasión linfática	304,9 [79,1–455,7]	0,504	31,1 [2,7–42,6]	0,565	421,8 [87,8–501,6]	0,629
No invasión linfática	291,8 [133,1–582,6]		13,3 [3,8–31,0]		384,4 [161,0–627,4]	
Invasión neural	350,5 [84,9–498,5]	0,728	13,4 [2,7–42,1]	0,667	443,1 [86,8–537,7]	0,728
No invasión neural	275,8 [164,5–625,3]		14,5 [10,5–32,8]		384,4 [198,2–668,0]	

Tabla 11. Correlación de CTCs y clusters con invasión microscópica en VP.

Variable	CTCs libres (células/ml)	<i>p</i>	Clusters/ml	<i>p</i>	CTCs totales (células/ml)	<i>p</i>
Invasión vascular	321,7 [217,4–451,3]	0,104	16,3 [5,5–41,5]	0,362	374,2 [271,0–508,7]	0,089
No invasión vascular	184,5 [97,2–322,3]		12,3 [3,2–29,9]		247,2 [125,4–401,0]	
Invasión linfática	204,7 [74,0–514,3]	0,489	23,8 [5,8–52,5]	0,397	350,5 [88,9–635,6]	0,939
No invasión linfática	248,2 [118,2–377,3]		12,3 [4,3–31,3]		305,5 [138,2–419,2]	
Invasión neural	247,3 [94,3–375,3]	0,905	13,8 [5,5–34,5]	0,528	327,3 [120,6–492,4]	0,798
No invasión neural	222,5 [113,0–370,8]		10,3 [3,1–32,2]		285,2 [141,1–404,7]	

En resumen, tras haber analizado CTCs y *cluster* tanto en muestras de vía portal como de vía central, podemos concluir que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos en ambas vías de acceso y que no hay diferencias significativas entre ellas en cuanto a las características del tumor consideradas, tales como grado de diferenciación, tamaño y niveles preoperatorios de CA 19-9.

Sin embargo, en las determinaciones portales se observa una tendencia a la correlación entre los niveles de CTCs y *clusters* con la invasión vascular del tumor.

4. ANÁLISIS DE CTCs Y CLUSTERS EN RELACIÓN A LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

4.1. RESULTADOS GLOBALES DE SUPERVIVENCIA

En cuanto a la SG, la mediana de supervivencia fue de 18 meses [12,5-23,5] sin mortalidad postoperatoria. Treinta de los 35 pacientes (85,7%) sobrevivieron durante más de seis meses, continuando 20 de ellos (57,1%) vivos un año después del diagnóstico primario (Fig. 21).

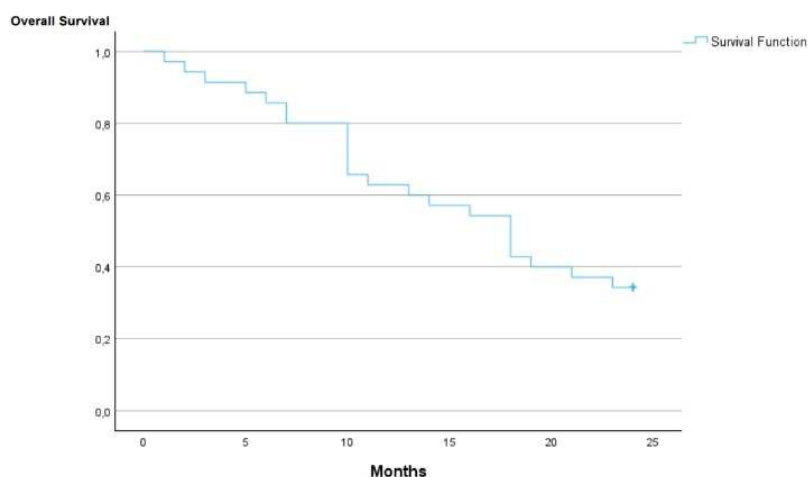


Fig. 21. Supervivencia global de los pacientes (meses).

4.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL EN FUNCIÓN DE LOS NIVELES DE CTCs Y CLUSTERS. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE VÍA PORTAL Y CENTRAL

Para valorar si las cifras de CTCs o *clusters* impactan en la supervivencia, se procedió a valorar puntos de corte en ambos parámetros.

Una vez calculada la media (m) y la desviación estándar (DE), en base a la aproximación de corte óptimo de Altman, estimamos el valor de p_{67} (o p_{33}) consultando en una tabla de probabilidad de la distribución normal el valor de $Pr(z < z) = 0,67$, que corresponde a $0,724$ [166]. Por lo tanto, estimamos ese cuartil como $m + 0.724s$.

De ahí que, el valor de CTCs y *clusters* se fijara en el percentil 33 (p_{33}), lo que resultó en un punto de corte de 185 CTCs y 15 *clusters* [167] (Fig. 22 y 23).

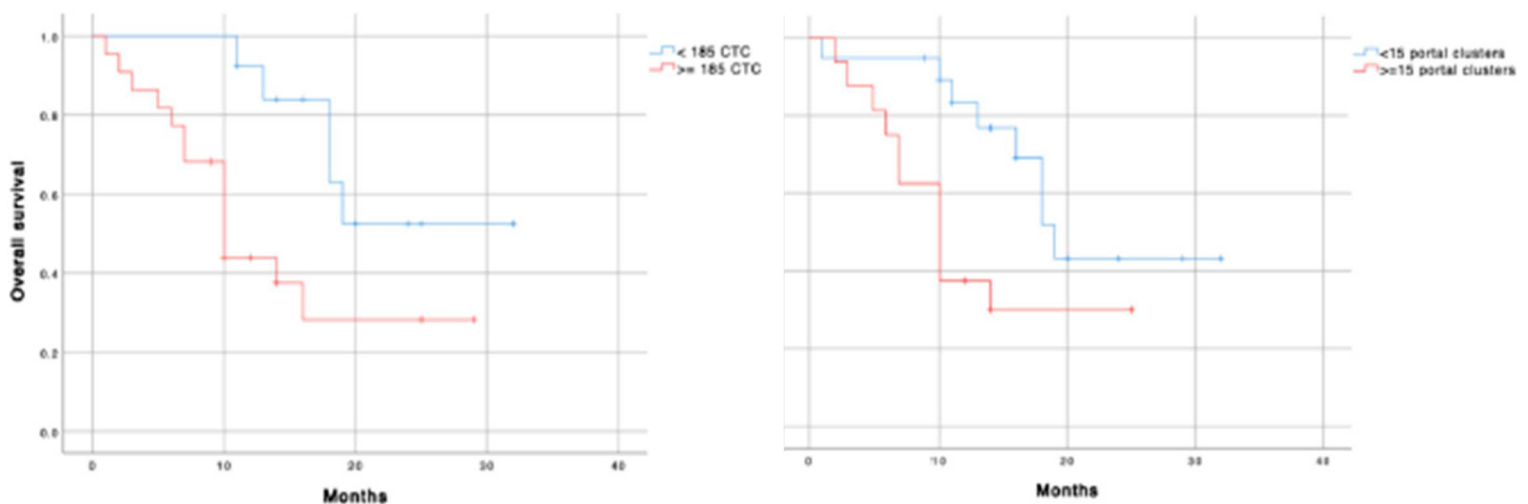


Fig. 22. SG según el punto de corte CTCs-VP (izquierda) y según punto de corte clusters-VP (derecha). Línea azul: baja expresión celular; Línea roja: alta expresión celular. ≥ 185 CTCs HR=3,263 [1,135-5,221]; $p=0,028$. ≥ 15 clusters HR=2,486 [0,989-6,247]; $p=0,053$.

Estos hallazgos no se encontraron en las muestras de CVC, en las que no hubo diferencias significativas en la supervivencia en función de los niveles de CTCs y *clusters*.

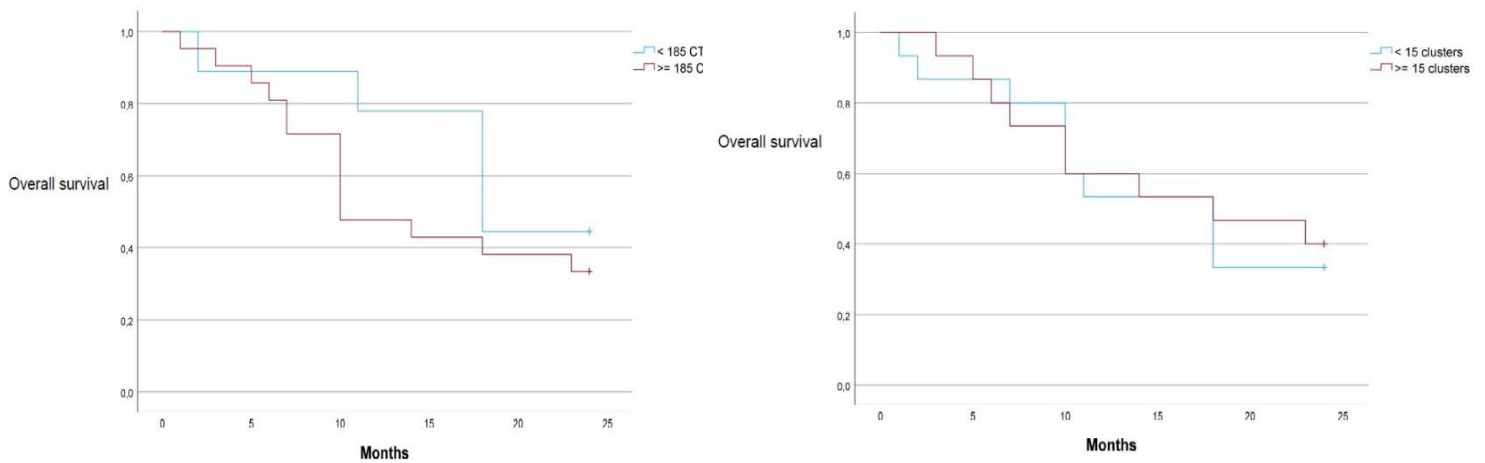


Fig. 23. SG según el punto de corte CTCs-CVC (izquierda) y según punto de corte clusters-CVC (derecha). Línea azul: baja expresión celular; Línea roja: alta expresión celular. No hay diferencias significativas.

4.3. FACTORES PRONÓSTICOS PARA LA SUPERVIVENCIA GLOBAL. ANÁLISIS UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE

En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior, en los que la vía portal demostró mejores resultados para la supervivencia que la vía central, se consideró llevar a cabo el análisis de factores pronósticos para la supervivencia en las determinaciones de sangre portal.

4.3.1. Análisis univariante

Con respecto a las mediciones en VP, la mediana de supervivencia de los pacientes fue significativamente mayor en aquellos con menos de 185 CTCs (24,5 meses [IC 95% 19,6-29,4]) frente a los 10 meses [IC 95% 7,4-12,5] que mostraron los pacientes que tuvieron más de 185 CTCs ($p=0,018$). De igual manera, aquellos pacientes que presentaron menos de 15 *clusters* mostraron una mediana de supervivencia de 19 meses [IC 95% 15,8-22,2] frente a los 10 meses [IC 95% 7,2-12,8] de los pacientes que tuvieron más de 15 *clusters* ($p=0,040$) (Tabla 12).

Los pacientes con invasión vascular ($p=0,005$), invasión linfática ($p=0,044$) y con tumores con un grado de diferenciación G3 ($p=0,003$) tuvieron menor supervivencia. Sin embargo, la invasión neural no se correlacionó con la SG.

Tabla 12. Mediana de supervivencia (meses) por grupos por análisis univariante.

Variable	Éxitus (%)	Mediana supervivencia	IC 95%	p
<185 CTCs portal	5 (38,5)	24,5	19,6–29,4	0,018
≥185 CTCs portal	14 (63,6)	10,0	7,4–12,5	
<15 clusters portal	8 (42,1)	19,0	15,8–22,2	0,040
≥15 clusters portal	11 (68,8)	10,0	7,2–12,8	
No invasión vascular	9 (40,1)	22,5	17,7–27,2	0,005
Invasión vascular	10 (76,9)	10,0	5,3–14,7	
No invasión linfática	11 (42,3)	18,0	15,6–23,8	0,044
Invasión linfática	8 (88,8)	10,0	5,6–14,4	
No invasión neural	7 (41,2)	21,5	15,5–27,4	0,249
Invasión neural	12 (66,7)	13,0	4,9–21,0	
Grado de diferenciación				0,003
G1 / G2	15 (53,5)	19,0	4,6–23,1	
G3	2 (40,0)	16,0	7,7–24,7	
SG	-	18,0	12,5-23,5	-

4.3.2. Análisis multivariante

Para identificar los factores pronósticos de supervivencia a largo plazo, utilizamos un análisis estratificado univariante y un multivariante mediante la regresión de Cox. El análisis multivariante mostró que tanto un número de CTCs<185 (HR=4,464; p=0,016) como la ausencia de invasión vascular (HR=3,663; p=0,013) fueron predictores independientes de mejor supervivencia a largo plazo (Tabla 13, Fig. 24).

Tabla 13. Factores pronósticos de supervivencia a largo plazo.

Variable	Univariante			Múltiple		
	HR	IC 95%	<i>p</i>	HR	IC 95%	<i>p</i>
Sexo (masculino)	2,050	0,789–5,325	0,140	-	-	-
Edad	1,000	0,949–1,054	0,988	-	-	-
Estadio I-II	1,566	0,555–4,415	0,396	-	-	-
≥185 CTCs portal	3,236	1,135–5,221	0,028	4,464	1,316–15,152	0,016
≥15 clusters portal	2,486	0,989–6,247	0,053	1,330	0,443–4,528	0,624
Invasión vascular	3,568	1,346–9,457	0,011	3,663	1,321-10,204	0,013
Invasión linfática	2,418	0,969-6,031	0,058	2,512	0,940-6,711	0,066
Invasión neural	1,698	0,666-4,328	0,268	-	-	-
G1 / G2 vs. G3	0,841	0,196-3,771	0,841	-	-	-

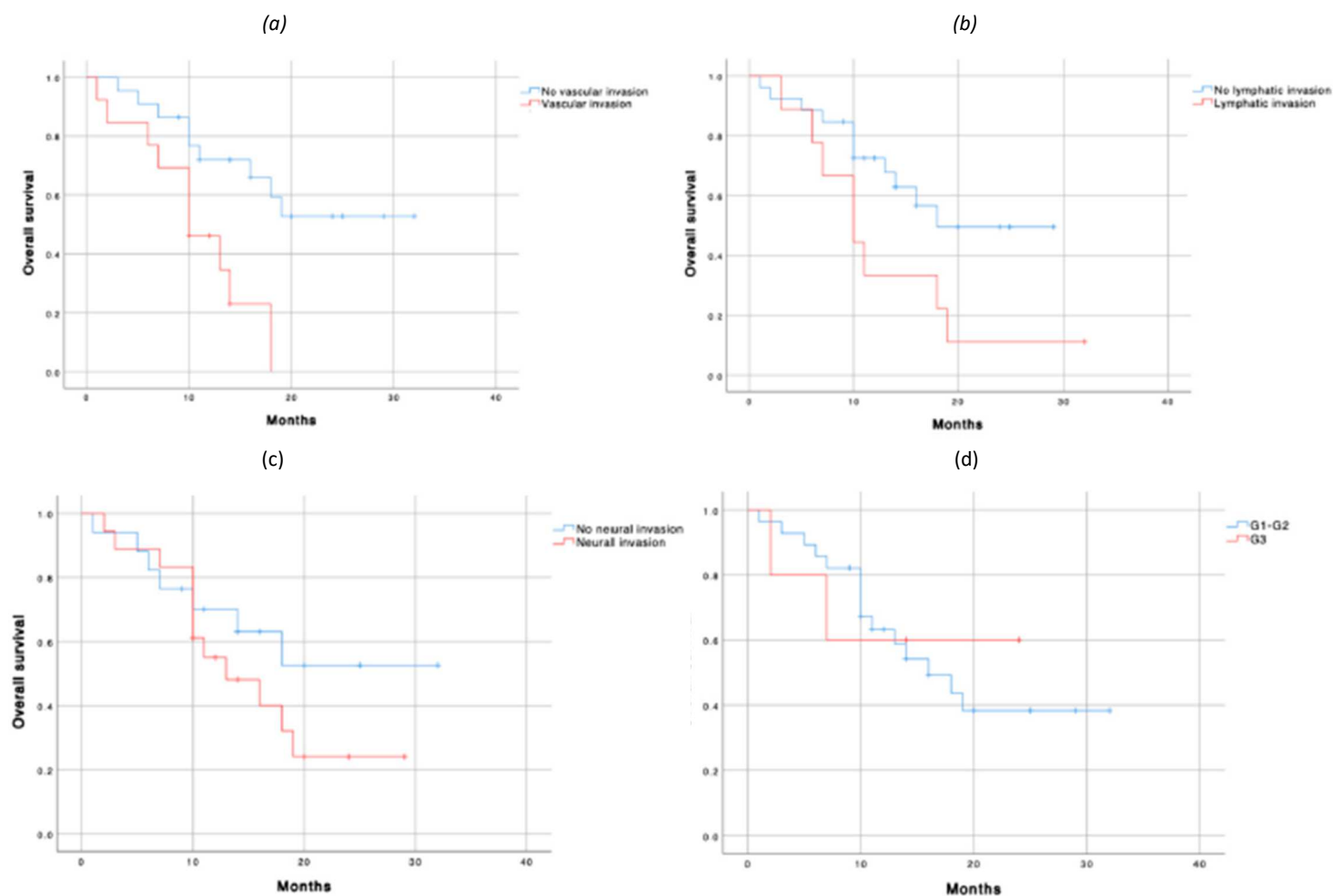


Fig.24. SG según: (a) Invasión vascular, HR=3,568 [1,346–9,457]; *p*=0,011; (b) Invasión linfática, HR=2,418 [0,969–6,031]; *p*=0,058; (c) Invasión neural, HR=1,698 [0,666–4,328]; *p*=0,268; y (d) Grado de diferenciación tumoral HR=0,841 [0,196–3,771]; *p*=0,841. Línea azul: no invasión o bajo grado (G1–G2); Línea roja: invasión o alto grado (G3).

5. FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

En este apartado abordaremos la supervivencia libre de enfermedad tanto en la recidiva local como en la metástasis a distancia.

Al igual que en la supervivencia global, para valorar el posible impacto de las CTCs y *clusters* en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) se llevó a cabo un estudio comparativo de los puntos de corte de las CTCs (185 CTCs/ml) y *clusters* (15 *clusters*/ml) en vía portal y en vía central. A diferencia de lo observado con la supervivencia global, en el análisis de la SLE no se observaron diferencias significativas entre la vía central y la vía portal. Dado que la vía portal ofreció mejores resultados en el análisis de la supervivencia, para mantener la homogeneidad en el estudio, los análisis realizados se ciñeron a los realizados en la vía portal.

5.1. FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN LOCAL

5.1.1. Análisis univariante

Excluyendo las resecciones incompletas, 23 pacientes (95,8%) tuvieron una supervivencia libre de progresión local durante más de seis meses, y 22 de ellos (91,7%) continuaban libres de progresión local un año después del diagnóstico primario. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la mediana de supervivencia en relación a los grupos de CTCs (Tabla 14, Fig. 25). De manera similar ocurrió con los *clusters* (Fig. 26).

Los pacientes con invasión linfática ($p=0,001$) se asociaron con una menor supervivencia. Sin embargo, la invasión vascular y neural no se correlacionaron con la SG.

Tabla 14. Mediana de supervivencia libre de progresión local global por grupos.

Variable	Mediana supervivencia	IC 95%	p
<185 CTCs portal	25,0	17,5-31,9	0,647
≥185 CTCs portal	28,5	24,1-32,9	
<15 clusters portal	29,0	23,9-34,3	0,787
≥15 clusters portal	22,5	19,3-26,2	
No invasión vascular	28,0	23,9-32,8	0,827
Invasión vascular	21,0	15,6-26,4	
No invasión linfática	28,0	23,9-32,1	0,001
Invasión linfática	12,0	8,5-15,7	
No invasión neural	23,0	19,2-26,7	0,520
Invasión neural	26,5	20,5-32,6	
SG	28,0	23,9-32,0	-

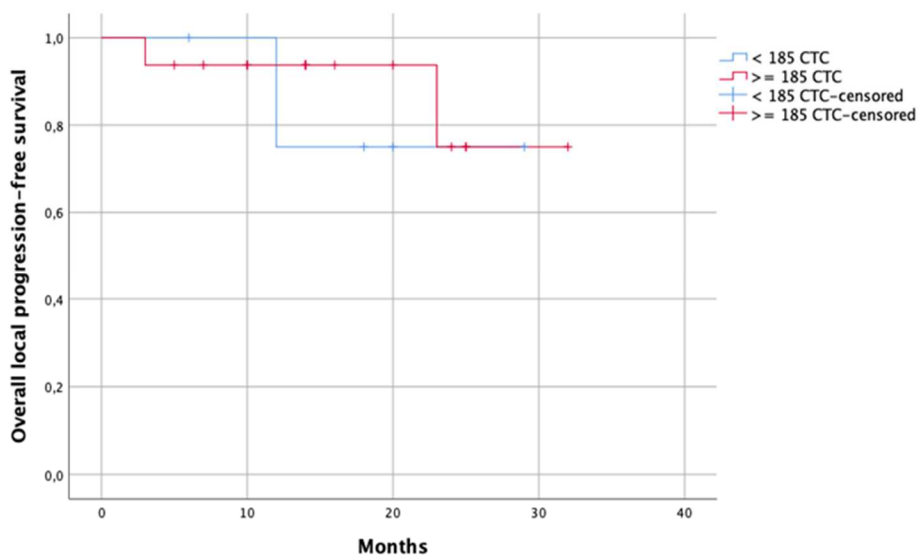


Fig. 25. Supervivencia libre de progresión local global (meses) según el punto de corte CTCs-VP.

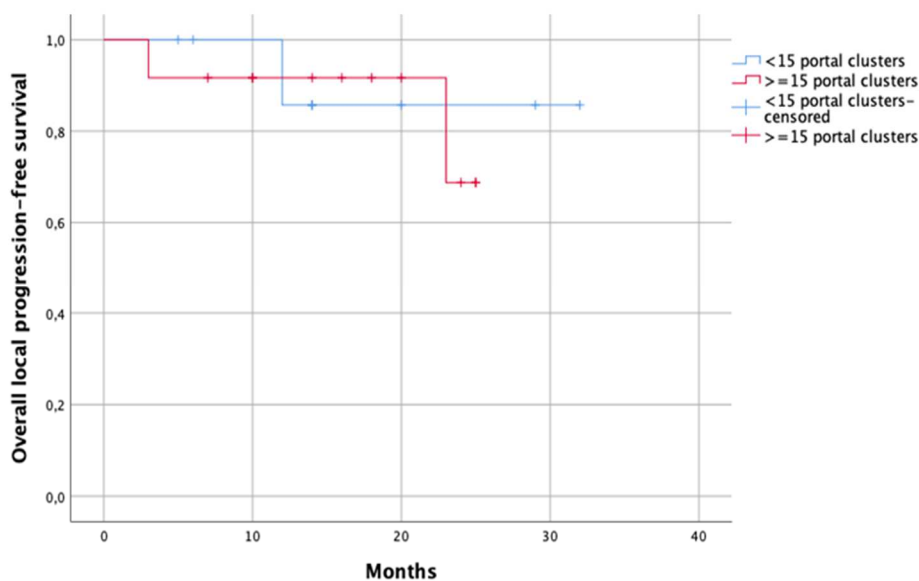


Fig. 26. Supervivencia libre de progresión local global (meses) según el punto de corte clusters-VP.

5.1.2. Análisis multivariante

De cara a identificar factores pronósticos para la progresión de la recurrencia local, se hizo un análisis univariante estratificado y un multivariante mediante la regresión de Cox. En ambos estudios, tan solo la invasión linfática se mostró como factor predictor independiente de recurrencia local (Tabla 15).

Tabla 15. Factores pronósticos de supervivencia libre de progresión local a largo plazo.

Variable	Univariante			Múltiple		
	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p
Edad	0,983	0,860-1,123	0,797	*		
Estadio I-II	0,048	0,005-0,484	0,010	1,732	0,108-27,891	0,698
≥185 CTCs portal	1,745	0,155-19,607	0,651	*		
≥15 clusters portal	1,393	0,125-15,580	0,788	*		
Invasión vascular	1,312	0,114-15,112	0,828	*		
Invasión linfática	4,950	1,210-20,249	0,026	4,133	1,109-21,152	0,031
Invasión neural	2,160	0,196-23,837	0,530	*		

* No incluido en el análisis de regresión múltiple de Cox final.

5.2. FACTORES PRONÓSTICOS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN SISTÉMICA

5.2.1. Análisis univariante

Excluyendo las resecciones incompletas, 19 pacientes (79,2%) tuvieron una supervivencia libre de progresión sistémica durante más de seis meses, y 18 de ellos (75,0%) continuaban libres de progresión sistémica un año después del diagnóstico primario. La mediana de supervivencia de los pacientes fue mayor en el grupo con menos de 185 CTCs en comparación con el grupo ≥ 185 CTCs, aunque las diferencias no fueron significativas (Tabla 16, Fig. 27). De manera similar ocurrió con los clusters (Fig. 28).

Tabla 16. Mediana de supervivencia libre de progresión sistémica global por grupos (meses).

Variable	Mediana supervivencia	IC 95%	p
<185 CTCs portal	20,5	12,1-29,4	0,636
≥185 CTCs portal	18,0	3,9-32,2	
<15 clusters portal	24,0	13,4-34,6	0,383
≥15 clusters portal	18,0	4,9-31,1	
No invasión vascular	15,0	7,5-21,8	0,024
Invasión vascular	18,0	11,5-24,5	
No invasión linfática	20,5	15,6-26,0	0,082
Invasión linfática	17,0	7,1-34,2	
No invasión neural	18,0	11,5-24,5	0,992
Invasión neural	16,5	11,0-22,1	
SG	18,0	11,5-24,5	-

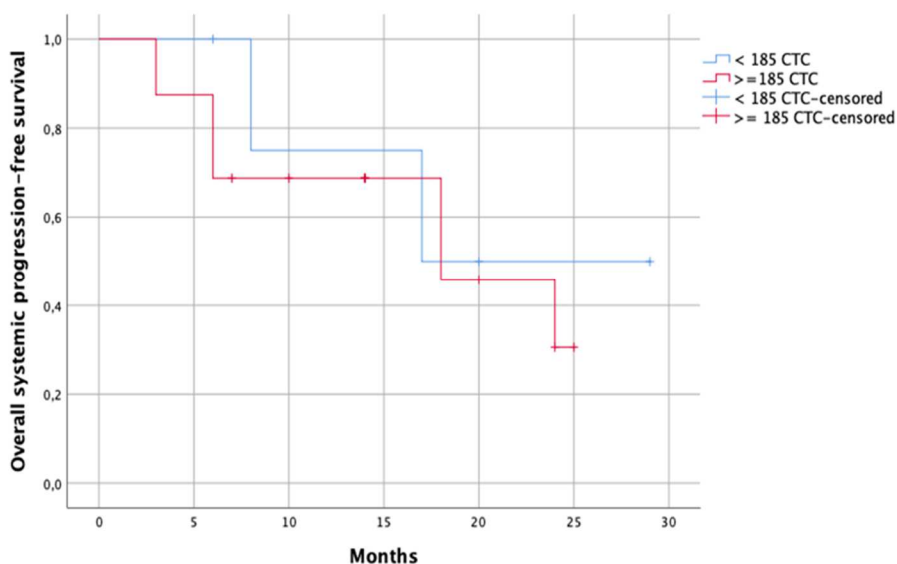


Fig. 27. Supervivencia libre de progresión sistémica global (meses) según el punto de corte CTCs-VP.

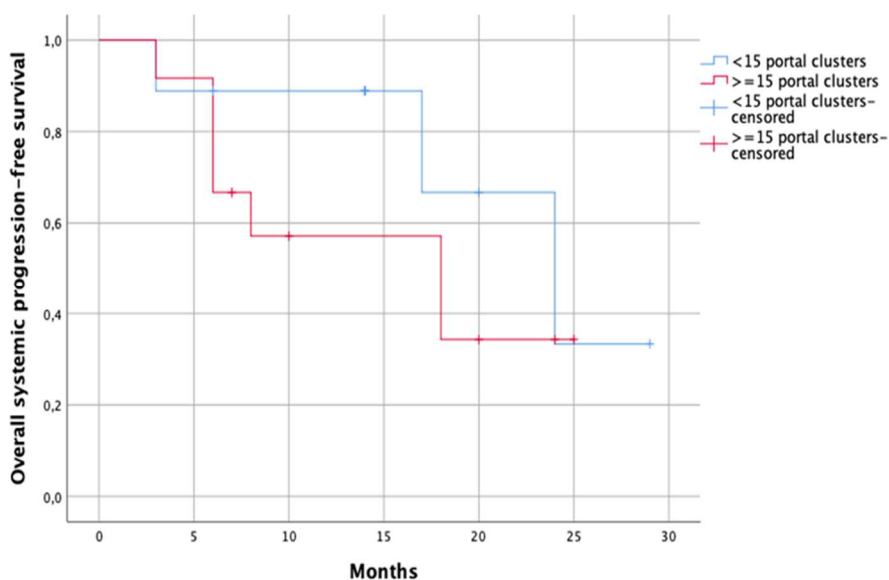


Fig. 28. Supervivencia libre de progresión sistémica global (meses) según el punto de corte clusters-VP.

5.2.2. Análisis multivariante

Para identificar factores pronósticos de supervivencia a largo plazo, utilizamos un análisis univariante estratificado que demostró que solo la invasión vascular determina una menor supervivencia libre de enfermedad para las metástasis. El análisis multivariante de Cox no logró determinar factores predictivos (Tabla 17).

Tabla 17. Factores pronósticos para la supervivencia libre de progresión sistémica a largo plazo.

Variable	Univariante			Múltiple		
	HR	IC 95%	<i>p</i>	HR	IC 95%	<i>p</i>
Edad	0,998	0,927-1,076	0,964	*		
Estadio I-II	0,310	0,066-1,441	0,135	*		
≥185 CTCs portal	1,433	0,303-6,763	0,650	*		
≥15 clusters portal	1,777	0,458-6,900	0,406	*		
Invasión vascular	38,46	0,138-106,383	0,204	*		
Invasión linfática	2,957	0,780-11,216	0,111	*		
Invasión neural	1,006	0,002-3,484	0,992	*		

* No incluido en el análisis de regresión múltiple de Cox final.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

El cáncer de páncreas es un tumor maligno intratable en el que la mayoría de los pacientes no muestran síntomas evidentes hasta que la enfermedad alcanza un estadio avanzado, lo que dificulta su detección precoz [6] y hace que el tratamiento sea tardío. Esta situación dificulta la tendencia hacia la mejoría en la curva de supervivencia de estos pacientes.

Tras la progresión del tumor, después de que se ha diseminado a otros órganos, se manifiesta como un inicio gradual de síntomas no específicos [7]. En caso del cáncer de páncreas metastásico la supervivencia es aún menor. La metástasis del cáncer representa el mayor porcentaje de todas las muertes relacionadas con el cáncer y es el factor determinante entre los cánceres de bajo riesgo, tratables mediante vigilancia activa, cirugía o terapia adyuvante, y los cánceres de alto riesgo que requieren un tratamiento terapéutico agresivo [87].

Uno de los puntos críticos en el abordaje terapéutico del cáncer de páncreas es determinar marcadores precoces que evalúen el pronóstico y faciliten así las decisiones terapéuticas. En la actualidad, debemos esperar a tener una biopsia adecuada para evaluar la información pronóstica. Las biopsias suelen ser difíciles de obtener antes de decidir si la mejor opción para el paciente es la cirugía o la quimioterapia. Por tanto, el reto es poder identificar marcadores precoces en estos pacientes.

La biopsia líquida es una forma mínimamente invasiva de obtener información del tumor como herramienta para la medicina personalizada [168-170]. Con esta técnica se puede obtener información importante a través del aislamiento y el análisis molecular de CTCs, ADNct, miARNs circulantes y VEs derivadas de tumores en varios fluidos corporales, principalmente sangre periférica. La biopsia líquida se centra en la detección temprana del cáncer, mejorando la estadificación del cáncer, la detección precoz de la recaída, el seguimiento en tiempo real de la eficacia terapéutica, la detección de dianas terapéuticas y los mecanismos de resistencia [112].

ADN tumoral circulante

Es uno de los analitos más investigados de la biopsia líquida, puesto que hay estudios que sugieren su potencial en la detección temprana del cáncer y la predicción de su recurrencia [114]. Se libera en la sangre

por apoptosis y necrosis de las células tumorales, por lo que está presente en altas concentraciones en la sangre de los pacientes con cáncer. Permite detectar tumores, reflejar la carga tumoral y monitorizar la respuesta a las terapias [111, 113].

Exosomas

Se pueden considerar indicadores biológicos potenciales de diferentes tipos de cáncer y se pueden usar en la detección temprana del cáncer de páncreas puesto que están presentes en la sangre antes que los causados por la necrosis [6, 111].

Células tumorales circulantes

Entre estas determinaciones, las CTCs, se han postulado como potenciales biomarcadores [161, 168, 171] en el diagnóstico diferencial precoz en el cáncer de páncreas. Se observan en la sangre periférica de pacientes con todo tipo de cáncer, pero es raro encontrarlas en individuos sanos o con enfermedades no malignas a diferencia de otros biomarcadores, como puede ser el CA 19-9 [194], que pueden ser identificados en afecciones no cancerosas. Las CTCs se encuentran en la mayoría de los pacientes con ADCP en cualquier etapa (localizado, localmente avanzado o metastásico) pero no se detectan en individuos sanos [137]. A pesar de ello su función en el cáncer de páncreas aún no se ha definido por lo que se abre un extenso campo de investigación en este sentido.

En el presente estudio, se analiza el valor pronóstico tanto de CTCs libres como de *clusters* presentes en las muestras de pacientes con adenocarcinoma en etapa temprana en la cabeza del páncreas. Hay estudios que sugieren que las CTCs pueden utilizarse como marcadores en el diagnóstico diferencial y precoz del cáncer de páncreas y, además, la combinación con otros biomarcadores ayudaría a mejorar la eficiencia diagnóstica [65, 138].

1. LIMITACIONES Y DISCUSIÓN DEL MÉTODO

1.1. LIMITACIONES

La primera limitación del estudio con la que nos encontramos fue el tamaño muestral. De los 280 pacientes que se presentaron en el comité de tumores, tan sólo 41 cumplieron los criterios de inclusión. Durante la cirugía, 3 de ellos fueron irresecables, en dos se detectaron metástasis y en otro paciente se pudieron hacer las extracciones pero no se pudo llevar a cabo el procesamiento por problemas técnicos con el Isoflux™. De ahí que el número final de pacientes que pudieron completar el estudio fueran 35 pacientes.

Si bien los datos obtenidos con estos pacientes nos han aportado resultados claros respecto a algunos de los objetivos marcados inicialmente en el estudio, en otros se detecta que sería necesaria una n mayor para poder obtener resultados determinantes.

La biopsia líquida ha demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento para el cáncer de páncreas por su naturaleza menos invasiva. Sin embargo, quedan algunos problemas que hay que resolver antes de que sus aplicaciones se puedan trasladar a la práctica clínica. Una de estas limitaciones es la menor sensibilidad y especificidad que presenta en comparación con la biopsia tradicional. Esto se debe a que la biopsia líquida detecta alteraciones en fluidos corporales en lugar del tumor en sí. Las CTCs son raras en pacientes con cáncer y pueden estar rodeadas por otros componentes de la sangre. A pesar de estas limitaciones sigue siendo una herramienta útil en la identificación de biomarcadores para el cáncer de páncreas. Debido a su naturaleza repetible y menos invasiva facilita el estudio de la progresión de la enfermedad en tiempo real. La mejora de esta técnica implica, por tanto, una mejora en la sensibilidad y especificidad así como una estandarización en cuanto a la detección, extracción y evaluación [111].

1.2. AISLAMIENTO DE CTCs

Las CTCs son liberadas del tumor sólido primario al torrente sanguíneo y pueden proporcionar información relevante para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer [172, 173]. Sin embargo, su

determinación en el cáncer de páncreas sigue siendo incierta ya que se han utilizado diferentes marcadores para detectar formas heterogéneas de CTCs [170, 174-176]. Por otro lado, se han propuesto los *clusters* como posibles factores pronósticos en el adenocarcinoma de páncreas [177]. Sin embargo, no se ha determinado el papel potencial del número de células dentro de los *clusters* o su tamaño.

En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de técnicas de detección de CTCs, basadas en diferentes principios y rendimientos [153, 163, 178], porque se ha demostrado que su detección puede estar relacionada con la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, actualmente, existen muchas cuestiones sin resolver en cuanto a la aplicación clínica de CTCs en pacientes con cáncer, relacionadas con la precisión, sensibilidad y especificidad de la técnica, determinación del punto de corte en los niveles de CTCs que tengan correlación con la supervivencia así como la selección de marcadores idóneos para su identificación.

Una de las moléculas de superficie más común en las CTCs es EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales), que se origina a partir del epitelio, está presente en el 80% de los tumores sólidos y ausente en células sanguíneas periféricas. Entre las CTCs y las células sanguíneas, no sólo existen diferencias bioquímicas sino que también existen diferencias físicas, como pueden ser el tamaño y la rigidez.

Es por ello por lo que elegimos el sistema EpCAM-Isoflux™ para su aislamiento. En trabajos anteriores, se aislaron significativamente más CTCs utilizando el mismo método de aislamiento basado en EpCAM con el sistema IsoFlux™, en comparación con CellSearch®. Sin embargo, la comparativa de las dos plataformas para el aislamiento de CTCs es compleja debido a que utilizan diferentes clones de anticuerpo y diferentes perlas magnéticas para el proceso de captura.

El sistema IsoFlux™ utiliza microesferas a escala micrométrica, que generan un momento magnético que es suficiente para capturar células incluso con una baja expresión de marcadores [179]. En la literatura se han reportado diferentes sensibilidades de detección. Aún así, no son comparables con nuestro estudio porque hemos utilizado un método de enriquecimiento altamente efectivo con una forma automatizada de enumeración, lo que nos ha permitido detectar CTCs en el 100% de las muestras en pacientes con cáncer de páncreas temprano. El trabajo de Hugenschmidt y col. estudió CTCs de muestras de sangre antes de la cirugía, incluidos pacientes en estadios avanzados con enriquecimiento CellSearch® y análisis manual de imágenes, obteniendo un 7% de detección [180]. White y col. aumentaron la sensibilidad de detección al 71% porque

estudiaron CTCs a partir de muestras de vía portal e incluyeron pacientes en estadios avanzados con enriquecimiento CellSearch® y análisis manual de imágenes [181]. Buscail y col. detectó 45-59% con dos técnicas diferentes de enriquecimiento de CTCs utilizando un dispositivo de identificación ddPCR para KRAS con una tasa de mutación del 92% en ADCP e incluyendo pacientes con estadios avanzados [182].

A pesar de que el sistema CellSearch® se considera el método más estandarizado para la detección de CTCs, presenta una sensibilidad relativamente baja en comparación con el sistema Isoflux™ que permite una recuperación casi completa de las CTCs intactas. Muchos trabajos han informado de los buenos resultados del sistema Isoflux™ para aislar CTCs en diferentes tipos de cáncer [183-190]. Alva y col. analizaron muestras de sangre de pacientes con cáncer de vejiga por ambos sistemas, CellSearch® e Isoflux™, concluyendo que el sistema Isoflux™ mostraba una mayor sensibilidad para la detección de CTCs en este tipo de cáncer, lo cual podría ser debido a que el sistema Isoflux™ consigue un flujo más uniforme y una mayor fuerza magnética dentro del cartucho de aislamiento [183]. La tasa de recuperación de CTCs en pacientes con cáncer colorrectal fue mayor con el sistema Isoflux™ que la descrita por el sistema CellSearch® (87% frente al 23%, respectivamente) [191]. Sánchez-Lorencio y col. , al igual que en los trabajos anteriores, encontró una mayor sensibilidad en la detección de CTCs en pacientes con HCC en lista de espera de trasplante con el sistema Isoflux™. Obtuvieron diferencias significativas en los niveles de CTCs resultantes con los dos sistemas, CellSearch® e Isoflux™, aislando CTCs en el 8,3% y en el 83,33% de las muestras, respectivamente [186].

Con estos precedentes podemos determinar que el sistema Isoflux™ es un sistema optimizado para conseguir una elevada tasa de recuperación en células que expresan EpCAM en su superficie.

1.3. MÉTODO DEL ALGORITMO DE LA TRANSFORMADA DE HOUGH

Para el aislamiento de CTCs mediante el sistema Isoflux™, se define la población de células tumorales en base a los criterios previamente publicados en otros trabajos [188, 192, 193]. EpCAM es una de las proteínas más expresadas en las CTCs y también se sobreexpresa en tumores y otras células. Tras el aislamiento de células potencialmente tumorales mediante el marcador EpCAM catalogamos, utilizando microscopía de fluorescencia, las CTCs reales como CK+/CD45-/ células nucleadas morfológicamente intactas

(Hoechst 33342+). Dado que la selección inmunomagnética positiva que se ha utilizado no es 100% eficaz para discriminar las células contaminantes de CD45, si las hubiera, se utilizaron anticuerpos dirigidos contra CD45 para identificar y diferenciar las CTCs de las PBMC CD45+, así como de globulos rojos y plaquetas Hoechst 33342-. Diferentes combinaciones de dispositivos y software para la enumeración de CTCs han mostrado sensibilidad, especificidad y una alta correlación en el número de CTCs detectadas, pero siempre bajo la supervisión de un técnico. El software Isoflux™ Cytation Imager se utiliza con frecuencia, pero no se ha encontrado evidencia en términos de su sensibilidad y precisión.

Para la cuantificación y caracterización de CTCs y *clusters* utilizamos un método basado en el algoritmo de la transformada de Hough, un método semiautomático en el que la interacción del usuario sólo se requiere para especificar el umbral y eliminar el ruido. Es una técnica que permite identificar formas en imágenes.

Para la validación de esta técnica se realizaron análisis en los que se incluyeron líneas celulares tumorales (CCP), como controles positivos, y muestras de donantes sanos, como controles negativos. En cuanto a la recuperación de células cancerosas, el método Hough-Isoflux™ mostró una tasa de recuperación de CCP del 80,75%. Además, encontramos una alta sensibilidad (89,00%) y precisión (91,00%) para la detección de CTCs, similar a otros analizadores, como el CellSpotter® [163], que mostró una sensibilidad del 85% y una precisión del 99,7%. Aunque la sensibilidad y la precisión mostraron buenos resultados, no son perfectos. En esa línea de pensamiento, algunos autores, como Chen y col. [194], mejoraron sus resultados combinando CTCs con CA 19-9.

Aunque la literatura disponible proporciona varias sensibilidades de detección, esos valores no son comparables a los de nuestro estudio. La razón es que utilizamos una técnica de enriquecimiento de alto rendimiento, seguida de un método automatizado de enumeración. Esto llevó a la detección de CTCs en el 100% de las muestras estudiadas de pacientes con cáncer de páncreas precoz. Cuando se evaluó la linealidad entre ambos métodos, Manual-Isoflux™ y Hough-Isoflux™, se encontró una alta correlación entre ellos ($R^2=0,988$ y $R^2=0,974$, respectivamente). Esto se observó tanto en los controles positivos como en los controles negativos así como en los pacientes con CP.

Puesto que los *clusters* están relacionados con metástasis tumorales [153-155], su determinación es muy importante para fines clínicos. En el presente estudio hubo una alta correlación entre ambos métodos para

la detección de CCP en los grupos controles, pero se encontró una menor correlación en muestras de pacientes con ADCP. Esto podría explicarse porque se incluyeron parámetros restrictivos en el software para evitar el conteo de artefactos en el muestra. En este sentido, se consideró que sería más apropiado mejorar la precisión en lugar de aumentar los falsos positivos. Además, otra explicación para un menor coeficiente de correlación entre el método Manual-Isoflux™ y el método Hough-Isoflux™ podría estar relacionada con la máscara binaria generada durante el procesamiento de datos después de las operaciones lógicas realizadas con cada canal de color. Esta máscara binaria se obtiene después de una multiplicación lógica entre las máscaras binarias de los canales azul y verde (Hoechst 33342 y CK, respectivamente) y, finalmente, eliminamos los píxeles de umbral del canal rojo (CD45). El objetivo es cuantificar los componentes teñidos de azul y verde pero no de rojo, descartando de esta forma las células con expresión de CD45.

La implementación de esta máscara es un paso crucial para la alta sensibilidad y precisión en los recuentos de CTCs, que tienen una morfología redondeada bien definida. Los clusters, por el contrario, muestran formas irregulares con dos o más CTCs dentro de ellos, lo que a menudo resulta en CTCs superpuestas que son más difíciles de identificar en base a la transformada de Hough.

Un enfoque potencial para mejorar los coeficientes de correlación, podría ser aumentar el factor de sensibilidad para encontrar círculos superpuestos en una forma irregular. Sin embargo, este factor podría contar eventos que no fueran CTCs o contar una CTC más de una vez. Por lo tanto, este punto necesita más investigación.

Usando el método Hough-Isoflux™, se pudo determinar el tamaño de CTCs y *clusters*. Sin embargo, estas mediciones son una estimación porque se mide la correlación entre Hoechst 33342 y CK (Figura 17). CK marcó el citoplasma, mientras que Hoechst 33342 marcó el núcleo celular. Por tanto, en algunos casos, la CK fue más representativa que la correspondencia en la determinación del tamaño celular.

Una limitación de este método para este enfoque clínico específico es que requiere más memoria que en otros campos ya que se necesitan varias imágenes debido a la generación de máscaras. Este proceso puede producir imágenes de más de 7000 x 7000 píxeles. Por lo tanto, el coste computacional de la técnica es alto.

La elección de la medición por este método se debe a que la transformada de Hough resulta ser un método excelente para contar CTCs, definida como una célula nucleada EpCAM, CK positiva, pero negativa

para CD45, siendo además fácil de implementar puesto que puede generar resultados en tiempo real, lo cual es muy adecuado para el recuento de CTCs en aplicaciones clínicas. Este método de análisis de imágenes podría extrapolarse para contar CTCs aisladas por CellSearch® u otro dispositivo cuando las muestras están etiquetadas con EpCAM.

Además, este enfoque podría permitir contar otras células al procesar los canales de imagen de acuerdo con la expresión de las manchas que definen las células en estudio [14].

El presente estudio determinó las características tanto de CTCs libres (número y tamaño) como *clusters* (número, tamaño y CTCs dentro de *clusters*) mediante inmunofluorescencia con Hoechst 33342, marcador epitelial de CK y CD45 a través de la medición de CTCs por transformada de Hough.

2. VÍA PORTAL vs. VÍA CENTRAL

Se obtuvieron muestras de CVC y VP para determinar el mejor enfoque para evaluar la correlación potencial de las mediciones de CTCs con el pronóstico del paciente. Las CTCs podrían detectarse en las primeras etapas del CP en ambas muestras de sangre (CVC y VP) en todos los pacientes.

Se encontraron más CTCs y *clusters* en las muestras de CVC que en las muestras de VP, a diferencia de todos los demás resultados publicados anteriormente y la comprensión actual. Sin embargo, las diferencias entre las CTCs detectadas en VP y CVC no son significativas. Como posibles explicaciones se propone, en primer lugar, que la extracción de sangre portal se realiza con agujas finas; por el contrario, CVC se realiza a través de la ruta central en sí, lo que lleva a una mayor destrucción de células en VP. En segundo lugar, las CTCs obtenidas en VP durante la cirugía podrían ser más susceptibles a la apoptosis; en cambio, las CTCs sanguíneas centrales, al llevar más tiempo en el torrente sanguíneo, sufren cambios fenotípicos que les permitirían sobrevivir más tiempo. Y tercero, en VP, solo se detectaron CTCs recién descargadas en el torrente sanguíneo portal, pero en CVC, las CTCs podrían deberse a descargas anteriores que permanecieron en el torrente sanguíneo. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas; por lo tanto, se considera que este hallazgo no es clínicamente relevante, a diferencia del impacto de los niveles de CTCs en el VP asociado con la supervivencia.

Un estudio de casos y controles sería imposible de realizar porque los controles negativos de las muestras de VP no estarían éticamente aprobados porque existen riesgos quirúrgicos en ese muestreo. Para obtener una muestra óptima de la VP quirúrgica, es necesario realizar una disección del conducto biliar y una transección; esta disección solo es posible en cirugías seleccionadas como la duodenopancreatectomía, la hepaticoyeyunostomía o el trasplante hepático. Desafortunadamente, la mayoría de estos procedimientos se realizan en pacientes con cáncer o cirrosis hepática en quienes se presenta hepatocarcinoma (HCC). Aún así, no pudimos considerarlos verdaderos negativos porque las CTCs probablemente estaban relacionadas con el HCC.

CTCs y clusters en sangre portal y central según grado de diferenciación

El número de CTCs dentro de *clusters* es mucho mayor en tumores con un grado de diferenciación G3 que en tumores de grado G1/G2 y esto resulta en ambas muestras (CVC y VP).

Una vez que las células de CP invaden los capilares en el tejido tumoral, pueden ingresar a la vena porta para la metástasis distal, como la metástasis en el hígado y el pulmón. Los cánceres de bajo grado (G1) tienden a crecer y diseminarse más lentamente que los cánceres de alto grado (G3). La mayoría de las veces, los cánceres de páncreas con un grado de diferenciación G3 tienden a tener un mal pronóstico en comparación con los cánceres de grado G1/G2 [67-69].

Los *clusters* son altamente metastásicos. Aceto y col. han demostrado que los *clusters* en pacientes metastásicos estaban relacionados con una supervivencia más corta [154]. Un *cluster* puede incluir otras células, como plaquetas, células inmunitarias y fibroblastos asociados con el cáncer, lo que proporciona un microambiente local que protege las CTCs dentro del *cluster* y facilita la colonización [133]. Por lo tanto, la cuantificación de las CTCs agrupadas podría agregar información pronóstica relevante.

CTCs y clusters en sangre portal y central según tamaño y niveles de CA 19-9

En ambas muestras (CVC y VP), el valor de CA 19-9 tiene una correlación positiva con CTCs y *clusters*. Para realizar estos análisis se utiliza el coeficiente de correlación de Spearman (Rho), con valores comprendidos entre -1 y 1. El valor 1 indica una correlación positiva perfecta entre las variables, el valor 0 indica que no hay correlación entre las variables y el valor -1 indica una correlación negativa perfecta entre las variables. Cuanto más cerca esté Rho de cero, más débil será la correlación entre variables.

El coeficiente de correlación de Spearman permite observar que el número de CTCs totales está directamente relacionado con el tamaño del tumor. Cuanto mayor sea el tamaño del tumor, mayor será el número total de CTCs para ambas muestras de sangre (CVC y VP). Pero un dato crítico que permite vislumbrar la fisiología de CTCs es que los *clusters* y el número de CTCs dentro de *clusters* tienen una relación indirecta para CVC y directa para VP en el caso de los *clusters*.

La muestra de sangre en VP se toma más cerca del tumor primario único; estos hallazgos permitirían sugerir que los *clusters* disminuyen de tamaño en el trayecto desde la vena porta, a través del hígado, hasta el torrente sanguíneo, disminuyendo el número de células en su interior y liberándolas, por tanto, como CTCs libres. Sin embargo, la ubicación física de las CTCs cambia, el número total permanece constante y en relación directa con el tamaño del tumor.

CTCs y clusters en sangre portal y central según invasión microscópica

La invasión neural, vascular y linfática son también factores relacionados con la supervivencia. En el presente estudio, no se encuentra una correlación significativa entre las mediciones de CTCs y la invasión microscópica.

Sin embargo, en pacientes con invasión vascular se observa un elevado número de CTCs, tanto libres como totales, en muestras de VP respecto a los que no la tienen. En estas determinaciones se observa una tendencia a la correlación entre los niveles de CTCs y *clusters* con la invasión vascular.

De aquí se puede deducir que el mecanismo biológico de la dispersión hematogena del tumor está

asociado con la invasión vascular.

Dado el bajo número de pacientes, este trabajo es un generador de hipótesis que determina que la presencia de CTCs en VP podría ser un factor pronóstico para predecir mal pronóstico en CP temprano. Para validar esta propuesta, estos resultados necesitan validación con una población de pacientes más grande y un seguimiento más prolongado.

CTCs y clusters en sangre portal y central en relación a la supervivencia global

El ADCP es uno de los cánceres más agresivos asociado con un mal pronóstico y una alta mortalidad, teniendo el menor índice de resecabilidad y una baja tasa de supervivencia a 5 años, debido principalmente a su diagnóstico tardío.

Generalmente, solo el 24% de las personas sobreviven 1 año después del diagnóstico y el 9% sobreviven 5 años [73]. La cirugía puede prolongar la supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas en etapa temprana en al menos 2 años [74]. A pesar de la n reducida con la que cuenta el estudio este dato coincide con los resultados obtenidos para la supervivencia global, puesto que la mediana de supervivencia fue de 18 meses postoperatoria.

Sin embargo, incluso cuando la resección se realiza con éxito, la tasa de supervivencia global de 5 años sigue siendo de alrededor del 10-25%; pero si el cáncer se ha diseminado a otros órganos o tejidos circundantes, la tasa de supervivencia a 5 años es del 12% post-quirúrgico. El 52% de las personas diagnosticadas después de que el cáncer se ha diseminado a una parte distante del cuerpo, tiene una tasa de supervivencia a 5 años del 3%. A pesar de la resección radical (R0), presentará recaídas locales o a distancia después de la cirugía, el 80% de los pacientes. Para poder realizar la comparativa de estos datos con los obtenidos en el estudio sería necesario un seguimiento de los pacientes a más largo plazo, es decir, más allá de los 24 meses.

Hay estudios que demuestran que la quimioterapia adyuvante después de la cirugía puede mejorar la mediana de supervivencia en comparación con la ausencia de quimioterapia [75-79], sin embargo, sólo el 15-20% de los pacientes con CP son candidatos a cirugía debido a la presentación tardía de la enfermedad [13].

Como se observó en otros estudios, en pacientes con estadios tempranos [137, 148, 195], ninguno de los parámetros evaluados por CTCs se correlacionó con el CA 19-9 preoperatorio o el tamaño del tumor/estadio TNM medido por TC ya sea de CVC o VP. Sin embargo, se encuentra por primera vez que el número de *clusters* (> 20 grupos/ml) y de CTCs dentro de *clusters* (> 64 CTC) medidos en VP se correlacionaron con un grado negativo de diferenciación tumoral en la biopsia. Estos hallazgos podrían orientar el diagnóstico preoperatorio cuando es imposible realizar una biopsia preoperatoria.

Actualmente, la correlación de los valores de CTCs con la supervivencia libre de progresión o las metástasis hepáticas en el adenocarcinoma de páncreas no avanzado sigue siendo controvertida [137, 148, 195, 196].

Para poder determinar si los niveles de CTCs y *clusters* tenían impacto en la supervivencia, se procedió a valorar puntos de corte en ambos parámetros. Una vez calculada la media (m) y la desviación estándar (DE), en base a la aproximación de corte óptimo de Altman, se estima el valor de p_{67} (o p_{33}) consultando en una tabla de probabilidad de la distribución normal el valor de $Pr(z < z) = 0,67$, que corresponde a 0,724 [168]. Por lo tanto, se determina ese cuartil como $m + 0.724s$. Normalmente, la literatura usa Q_3 (p_{75}) para considerar el valor alto y Q_1 (p_{25}) para valores bajos. Se decide usar p_{33} en lugar de p_{25} para aumentar la sensibilidad a menor especificidad. Para evaluar posibles puntos de corte, no es recomendable utilizar valores extremos en cada lado. Por lo que se excluye entre el 5-10% de cada criterio de valoración.

De ahí que, el valor de CTCs y *clusters* se fijara en el percentil 33 (p_{33}), lo que resultó en un punto de corte de 185 CTCs y 15 *clusters*.

En las muestras de CVC, no se encontraron diferencias significativas en el análisis de la supervivencia en función de los niveles de CTCs y *clusters*. Por el hecho de haber demostrado la VP mejores resultados para la supervivencia, más decantamos por esta vía en lugar de la central para llevar a cabo el análisis de factores pronósticos para la supervivencia.

3. FACTORES PRONÓSTICOS PARA LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

Según el análisis univariante, la supervivencia fue significativamente mayor en pacientes con menos de 185 CTCs y menos de 15 clusters. Así mismo tuvieron menor supervivencia aquellos pacientes con invasión vascular, invasión linfática y tumores con un grado de diferenciación G3. La invasión neural no se correlacionó con la SG.

En el análisis multivariante, más de 185 CTCs/ml en sangre portal (HR 4,464) e invasión vascular (HR 3,663) fueron predictores independientes de supervivencia. Estos hallazgos no se observaron en las determinaciones de CVC.

White y col. han descrito que el número de CTCs en VP se correlaciona con la supervivencia. Aún así, este trabajo se ha llevado a cabo en diferentes etapas del ADCP, con otro método de aislamiento y conteo manual, lo que explica que hayan encontrado CTCs en solo el 71% de las muestras de VP [181]. En coincidencia con el trabajo de White y col., la diferencia estaría dada por la metodología utilizada ya que estudios comparando CellSearch® e Isoflux™ demostraron que es hasta 8 veces más sensible, lo que explicaría el elevado número [179]. Al encontrar una tasa de positividad del 100%, se podría pensar que estas células estarían contaminadas con células epiteliales y, por lo tanto, se realizaron controles de calidad exhaustivos.

La originalidad de este trabajo está dada en la sensibilidad clínica que se ha demostrado a través de un punto de corte que permite discriminar el pronóstico de la enfermedad con cierta fiabilidad. En consecuencia, la presencia de células endoteliales falsas positivas no sería viable porque la CK no se expresa en estas células; por lo tanto, se considera que tal falso positivo es poco probable.

4. FACTORES PRONÓSTICOS PARA LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Al igual que en la supervivencia global, para valorar el posible impacto de las CTCs y *clusters* en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) se llevó a cabo un estudio comparativo de los puntos de corte de las CTCs (185 CTCs/ml) y *clusters* (15 *clusters*/ml) en vía portal y en vía central. A diferencia de lo observado con la supervivencia global, en el análisis de la SLE no se observaron diferencias

significativas entre la vía central y la vía portal. Dado que la vía portal ofreció mejores resultados en el análisis de la supervivencia, para mantener la homogeneidad en el estudio, los análisis realizados se ciñeron a los realizados en la vía portal.

En ambos análisis, univariante ($p=0,001$) y multivariante ($p=0,031$), en relación a la supervivencia libre de progresión local tan sólo la invasión linfática resultó tener correlación y se mostró como factor predictor independiente de recurrencia local.

En cuanto a la supervivencia libre de progresión sistémica, solo la invasión vascular demostró una menor supervivencia libre de enfermedad para las metástasis.

Al igual que en otros estudios [142, 196], el tiempo libre de enfermedad en aparición de metástasis y recurrencias locales fue menor en pacientes con valores por encima del punto de corte en CTCs y *clusters*, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por tanto, no podemos concluir que los niveles de CTCs y *clusters* sean predictores de metástasis o recidiva local en el seguimiento de los pacientes de nuestro estudio.

Se excluyeron los pacientes con metástasis, pero se analizaron los pacientes que desarrollaron metástasis durante el seguimiento. El objetivo del estudio fue evaluar las CTCs como parte de una biopsia líquida intraoperatoria con un tumor único no diseminado. Por definición, una biopsia líquida debe obtenerse mediante métodos no invasivos. Aunque obtener sangre de VP es clínicamente invasivo, dado que todos los pacientes incluidos en este estudio eran susceptibles de cirugía como parte de su tratamiento, se consideró que los análisis de CTCs de VP no implicaron un proceso invasivo adicional.

El estudio encontró que la determinación de CTCs y *clusters* en VP fue mejor que en CVC como marcadores pronósticos en pacientes con adenocarcinoma de cabeza de páncreas en estadio temprano. Por lo tanto, las determinaciones de *clusters* y el número de CTCs dentro de un *cluster* en VP podrían ser útiles para evaluar el grado de diferenciación del carcinoma de páncreas. El número de CTCs libres en VP sería beneficioso para determinar el pronóstico a largo plazo antes de la decisión terapéutica.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

En respuesta a los objetivos marcados al inicio del estudio, en base a los resultados obtenidos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. El método de la transformada de Hough ha resultado ser adecuado para la cuantificación y caracterización de CTCs, *clusters* y CTCs dentro de *clusters*, tras su aislamiento mediante el sistema Isoflux™.
2. Existe una buena correlación entre los resultados obtenidos en ambas vías de acceso, portal y central, y no hay diferencias significativas entre ellas en cuanto a las características del tumor consideradas, tales como grado de diferenciación, tamaño y niveles preoperatorios de CA 19-9.
3. Sin embargo, los resultados obtenidos en la vía portal mostraron una mayor correlación entre los niveles de CTCs y *clusters* con la supervivencia global, no observándose en la vía central.
4. En relación a la supervivencia global, la presencia de más de 185 CTCs/ml y la invasión vascular fueron factores predictores independientes de mal pronóstico a largo plazo.
5. En cuanto a los factores pronósticos de supervivencia libre de progresión local, tan solo la invasión linfática se mostró como factor predictor independiente de recurrencia local.
6. Finalmente, con respecto a los factores pronósticos de supervivencia libre de progresión sistémica, sólo la invasión vascular se asoció con una menor supervivencia libre de enfermedad para las metástasis, no pudiéndose contrastar en el análisis multivariante.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

1. Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Löhr JM, Neoptolemos J, Real FX, Van Laethem JL, Heinemann V. Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatology*. 2015 Jan-Feb;15(1):8-18. doi: 10.1016/j.pan.2014.10.001. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25547205.
2. GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory (GCO), <https://gco.iarc.fr/>
3. Heredia-Soto V, Rodríguez-Salas N, Feliu J. Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer: Are We Ready to Apply It in the Clinical Practice? *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 20;13(8):1986. doi: 10.3390/cancers13081986. PMID: 33924143; PMCID: PMC8074327.
4. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. 2019 Feb;10(1):10-27. doi: 10.14740/wjon1166. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30834048; PMCID: PMC6396775.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
6. Yan TB, Huang JQ, Huang SY, Ahir BK, Li LM, Mo ZN, Zhong JH. Advances in the Detection of Pancreatic Cancer Through Liquid Biopsy. *Front Oncol*. 2021 Dec 21;11:801173. doi: 10.3389/fonc.2021.801173. PMID: 34993149; PMCID: PMC8726483.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan;68(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21442. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29313949.
8. Mayer RJ: Cáncer de Páncreas. En: Kasper DL, Barunwald E, Fauci AS, et al: Harrison. Principios de Medicina Interna. 16ª edición. Mc Graw Hill. 2006. México DF.
9. Klatt EC: Robbins y Cotran. Atlas de Anatomía Patológica. 1ª edición. Elsevier España. 2007. Madrid.
10. Steer ML: Páncreas exocrino. En: Courtney M. Townsend, Daniel Beuchamp R, Mark Evers B, Kenneth L Mattox: Sabiston. Tratado de Cirugía. 18ª edición. Elsevier. 2009.
11. García-Borobia F, Fabregat-Proas J. Adenocarcinoma de páncreas y del área periampular. En: Parrilla-Paricio P y Landa-García JI: Cirugía AEC. 2ª edición. Ed. Médica Panamericana. 2010. Madrid.

12. Hruban RH, Klimstra DS. Adenocarcinoma of the pancreas. *Semin Diagn Pathol*. 2014 Nov;31(6):443-451. doi: 10.1053/j.semdp.2014.08.004. Epub 2014 Sep 2. PMID: 25441308; PMCID: PMC4313868.
13. Zhang L, Sanagapalli S, Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2018 May 21;24(19):2047-2060. doi: 10.3748/wjg.v24.i19.2047. PMID: 29785074; PMCID: PMC5960811.
14. Lizarazo Rodríguez, JI. Patogénesis del cáncer de páncreas. *Revista Colombiana de Gastroenterología* 2008 23(4), 391-399.
15. Moris M, Wallace MB. Intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystadenomas: current status and recommendations. *Rev Esp Enferm Dig*. 2017 May;109(5):358-367. doi: 10.17235/reed.2017.4630/2016. PMID: 28112959.
16. Fong ZV, Fernández-Del Castillo C. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. *Surg Clin North Am*. 2016 Dec;96(6):1431-1445. doi: 10.1016/j.suc.2016.07.009. PMID: 27865286.
17. Moreno-Planas JM, Sánchez-Ortega A, García-Bueno JM. Avances en cáncer de páncreas, del laboratorio a la clínica. CRC 2010.
18. Cai J, Chen H, Lu M, Zhang Y, Lu B, You L, Zhang T, Dai M, Zhao Y. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: Trends, risk factors, screening, and prognosis. *Cancer Lett*. 2021 Nov 1;520:1-11. doi: 10.1016/j.canlet.2021.06.027. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34216688.
19. Matsuda Y. Age-related morphological changes in the pancreas and their association with pancreatic carcinogenesis. *Pathol Int*. 2019 Aug;69(8):450-462. doi: 10.1111/pin.12837. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31339204.
20. Midha S, Chawla S, Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett*. 2016 Oct 10;381(1):269-77. doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.022. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27461582.
21. Wahi MM, Shah N, Schrock CE, Rosemurgy AS 2nd, Goldin SB. Reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women: a review of the literature. *Ann Epidemiol*. 2009 Feb;19(2):103-11. doi: 10.1016/j.annepidem.2008.11.003. PMID: 19185803.
22. Arnold LD, Patel AV, Yan Y, Jacobs EJ, Thun MJ, Calle EE, Colditz GA. Are racial disparities in pancreatic

- cancer explained by smoking and overweight/obesity? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Sep;18(9):2397-405. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0080. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19723915; PMCID: PMC3630792.
23. Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY, Gao F. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol.* 2021 Jul 21;27(27):4298-4321. doi: 10.3748/wjg.v27.i27.4298. PMID: 34366606; PMCID: PMC8316912.
 24. Zhao Z, Liu W. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technol Cancer Res Treat.* 2020 Jan-Dec;19:1533033820962117. doi: 10.1177/1533033820962117. PMID: 33357065; PMCID: PMC7768873.
 25. Yeo TP. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin Oncol.* 2015 Feb;42(1):8-18. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.12.002. Epub 2014 Dec 9. PMID: 25726048.
 26. Van Lier MG, Wagner A, Mathus-Vliegen EM, Kuipers EJ, Steyerberg EW, van Leerdam ME. High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol.* 2010 Jun;105(6):1258-64; author reply 1265. doi: 10.1038/ajg.2009.725. Epub 2010 Jan 5. PMID: 20051941.
 27. Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, Wang F, Sparr J, Raymond VM, Bandipalliam P, Stoffel EM, Gruber SB, Syngal S. Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA.* 2009 Oct 28;302(16):1790-5. doi: 10.1001/jama.2009.1529. PMID: 19861671; PMCID: PMC4091624.
 28. Landi S. Genetic predisposition and environmental risk factors to pancreatic cancer: A review of the literature. *Mutat Res.* 2009 Mar-Jun;681(2-3):299-307. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.12.001. Epub 2008 Dec 27. PMID: 19150414.
 29. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009 Dec;6(12):699-708. doi: 10.1038/nrgastro.2009.177. Epub 2009 Oct 6. PMID: 19806144.
 30. Feldmann G, Beaty R, Hruban RH, Maitra A. Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2007;14(3):224-32. doi: 10.1007/s00534-006-1166-5. Epub 2007 May

29. PMID: 17520196; PMCID: PMC2666331.
31. Gardner TB, Hessami N, Smith KD, Ripple GH, Barth RJ, Klibansky DA, Colacchio TA, Zaki B, Tsapakos MJ, Suriawinata AA, Putra J, Tsongalis GJ, Mody K, Gordon SR, Pipas JM. The effect of neoadjuvant chemoradiation on pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Pancreas*. 2014 Oct;43(7):1018-21. doi: 10.1097/MPA.000000000000162. PMID: 25000339.
32. Bosetti C, Rosato V, Li D, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Neale RE, Muscat J, Anderson K, Gallinger S, Olson SH, Miller AB, Bas Bueno-de-Mesquita H, Scelo G, Janout V, Holcatova I, Lagiou P, Serraino D, Lucenteforte E, Fabianova E, Baghurst PA, Zatonski W, Foretova L, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Negri E, Hassan M, Prizment A, Cotterchio M, Cleary S, Kurtz RC, Maisonneuve P, Trichopoulos D, Polesel J, Duell EJ, Boffetta P, La Vecchia C, Ghadirian P. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann Oncol*. 2014 Oct;25(10):2065-2072. doi: 10.1093/annonc/mdu276. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25057164; PMCID: PMC4176453.
33. Huang BZ, Pandol SJ, Jeon CY, Chari ST, Sugar CA, Chao CR, Zhang ZF, Wu BU, Setiawan VW. New-Onset Diabetes, Longitudinal Trends in Metabolic Markers, and Risk of Pancreatic Cancer in a Heterogeneous Population. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020 Jul;18(8):1812-1821.e7. doi: 10.1016/j.cgh.2019.11.043. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31809917; PMCID: PMC7269863.
34. Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol*. 2009 Jan;10(1):88-95. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70337-1. PMID: 19111249; PMCID: PMC2795483.
35. Andersen DK, Korc M, Petersen GM, Eibl G, Li D, Rickels MR, Chari ST, Abbruzzese JL. Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. *Diabetes*. 2017 May;66(5):1103-1110. doi: 10.2337/db16-1477. PMID: 28507210; PMCID: PMC5399609.
36. Jee SH, Ohrr H, Sull JW, Yun JE, Ji M, Samet JM. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. *JAMA*. 2005 Jan 12;293(2):194-202. doi: 10.1001/jama.293.2.194. PMID: 15644546.
37. Stocks T, Rapp K, Bjørge T, Manjer J, Ulmer H, Selmer R, Lukanova A, Johansen D, Concin H, Tretli S, Hallmans G, Jonsson H, Stattin P. Blood glucose and risk of incident and fatal cancer in the metabolic

- syndrome and cancer project (me-can): analysis of six prospective cohorts. *PLoS Med.* 2009 Dec;6(12):e1000201. doi: 10.1371/journal.pmed.1000201. Epub 2009 Dec 22. PMID: 20027213; PMCID: PMC2791167.
38. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010 Jun;24(3):349-58. doi: 10.1016/j.bpg.2010.02.007. PMID: 20510834.
 39. Midha S, Sreenivas V, Kabra M, Chattopadhyay TK, Joshi YK, Garg PK. Genetically Determined Chronic Pancreatitis but not Alcoholic Pancreatitis Is a Strong Risk Factor for Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 2016 Nov;45(10):1478-1484. doi: 10.1097/MPA.0000000000000684. PMID: 27518468.
 40. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013 Jun;144(6):1252-61. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.068. PMID: 23622135; PMCID: PMC3662544.
 41. Downes DP, Daurio NA, McLaren DG, Carrington P, Previs SF, Williams KB. Impact of Extracellular Fatty Acids and Oxygen Tension on Lipid Synthesis and Assembly in Pancreatic Cancer Cells. *ACS Chem Biol.* 2020 Jul 17;15(7):1892-1900. doi: 10.1021/acscchembio.0c00219. Epub 2020 May 26. PMID: 32396332.
 42. Feakins RM. Obesity and metabolic syndrome: pathological effects on the gastrointestinal tract. *Histopathology.* 2016 Apr;68(5):630-40. doi: 10.1111/his.12907. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26599607.
 43. Zheng W, Lee SA. Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk. *Nutr Cancer.* 2009;61(4):437-46. doi: 10.1080/01635580802710741. PMID: 19838915; PMCID: PMC2769029.
 44. Schernhammer ES, Hu FB, Giovannucci E, Michaud DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. Sugar-sweetened soft drink consumption and risk of pancreatic cancer in two prospective cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Sep;14(9):2098-105. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0059. PMID: 16172216.
 45. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Consumption of sugar and sugar-sweetened foods and the risk of pancreatic cancer in a prospective study. *Am J Clin Nutr.* 2006 Nov;84(5):1171-6. doi: 10.1093/ajcn/84.5.1171. PMID: 17093171.
 46. Mueller NT, Odegaard A, Anderson K, Yuan JM, Gross M, Koh WP, Pereira MA. Soft drink and juice consumption and risk of pancreatic cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Cancer Epidemiol*

- Biomarkers Prev. 2010 Feb;19(2):447-55. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0862. PMID: 20142243; PMCID: PMC3404432.
47. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Nov 28;22(44):9694-9705. doi: 10.3748/wjg.v22.i44.9694. PMID: 27956793; PMCID: PMC5124974.
 48. Chuang SC, Gallo V, Michaud D, Overvad K, Tjønneland A, Clavel-Chapelon F, Romieu I, Straif K, Palli D, Pala V, Tumino R, Sacerdote C, Panico S, Peeters PH, Lund E, Gram IT, Manjer J, Borgquist S, Riboli E, Vineis P. Exposure to environmental tobacco smoke in childhood and incidence of cancer in adulthood in never smokers in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Causes Control*. 2011 Mar;22(3):487-94. doi: 10.1007/s10552-010-9723-2. Epub 2011 Jan 30. PMID: 21279734.
 49. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC, Lerch MM, DiMagno EP. Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. *JAMA*. 2001 Jul 11;286(2):169-70. doi: 10.1001/jama.286.2.169. PMID: 11448279.
 50. Jayasekara H, English DR, Hodge AM, Room R, Hopper JL, Milne RL, Giles GG, MacInnis RJ. Lifetime alcohol intake and pancreatic cancer incidence and survival: findings from the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Cancer Causes Control*. 2019 Apr;30(4):323-331. doi: 10.1007/s10552-019-01146-6. Epub 2019 Feb 23. PMID: 30798509.
 51. Song C, Lv J, Liu Y, Chen JG, Ge Z, Zhu J, Dai J, Du LB, Yu C, Guo Y, Bian Z, Yang L, Chen Y, Chen Z, Liu J, Jiang J, Zhu L, Zhai X, Jiang Y, Ma H, Jin G, Shen H, Li L, Hu Z; China Kadoorie Biobank Collaborative Group. Associations Between Hepatitis B Virus Infection and Risk of All Cancer Types. *JAMA Netw Open*. 2019 Jun 5;2(6):e195718. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.5718. PMID: 31199446; PMCID: PMC6575146.
 52. El-Serag HB, Engels EA, Landgren O, Chiao E, Henderson L, Amaratunge HC, Giordano TP. Risk of hepatobiliary and pancreatic cancers after hepatitis C virus infection: A population-based study of U.S. veterans. *Hepatology*. 2009 Jan;49(1):116-23. doi: 10.1002/hep.22606. PMID: 19085911; PMCID: PMC2719902.
 53. Risch HA, Yu H, Lu L, Kidd MS. ABO blood group, Helicobacter pylori seropositivity, and risk of pancreatic cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Apr 7;102(7):502-5. doi: 10.1093/jnci/djq007.

Epub 2010 Feb 24. PMID: 20181960; PMCID: PMC2902822.

54. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology . *Pancreatic Adenocarcinoma. Version 1.2021* (Accessed February 27, 2021).
55. Aslanian HR, Lee JH, Canto MI. AGA Clinical Practice Update on Pancreas Cancer Screening in High-Risk Individuals: Expert Review. *Gastroenterology*. 2020 Jul;159(1):358-362. doi: 10.1053/j.gastro.2020.03.088. Epub 2020 May 19. PMID: 32416142.
56. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*. 2021 Sep 7;326(9):851-862. doi: 10.1001/jama.2021.13027. Erratum in: *JAMA*. 2021 Nov 23;326(20):2081. PMID: 34547082; PMCID: PMC9363152.
57. Fernández-del Castillo C. Clinical manifestations, diagnosis, and staging of exocrine pancreatic cancer. UpToDate website. <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-staging-of-exocrine-pancreatic-cancer>. Updated July 11, 2023. Accessed August 2, 2023.
58. National Cancer Institute. Physician Data Query (PDQ). Pancreatic Cancer Treatment – for Health Professionals. 2018. Accessed at <https://www.cancer.gov/types/pancreatic/hp/pancreatic-treatment-pdq> on August 2, 2023.
59. National Cancer Institute. Physician Data Query (PDQ). Pancreatic Cancer Treatment – for Health Professionals. 2018. Accessed at <https://www.cancer.gov/types/pancreatic/hp/pancreatic-treatment-pdq> on August 4, 2023.
60. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma. V.1.2020. Accessed at https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/pancreatic.pdf on August 5, 2023.
61. Mauro LA, Herman JM, Jaffee EM, Laheru DA. Chapter 81: Carcinoma of the pancreas. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Dorshow JH, Kastan MB, Tepper JE, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 5th ed. Philadelphia, Pa. Elsevier: 2014.
62. Winter JM, Brody JR, Abrams RA, Lewis NL, Yeo CJ. Chapter 49: Cancer of the Pancreas. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 10th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2015.

63. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol*. 2012 Jun;3(2):105-19. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021. PMID: 22811878; PMCID: PMC3397644.
64. Bergquist JR, Puig CA, Shubert CR, Groeschl RT, Habermann EB, Kendrick ML, Nagorney DM, Smoot RL, Farnell MB, Truty MJ. Carbohydrate Antigen 19-9 Elevation in Anatomically Resectable, Early Stage Pancreatic Cancer Is Independently Associated with Decreased Overall Survival and an Indication for Neoadjuvant Therapy: A National Cancer Database Study. *J Am Coll Surg*. 2016 Jul;223(1):52-65. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2016.02.009. Epub 2016 Feb 23. PMID: 27049786.
65. Gu YL, Lan C, Pei H, Yang SN, Liu YF, Xiao LL. Applicative Value of Serum CA19-9, CEA, CA125 and CA242 in Diagnosis and Prognosis for Patients with Pancreatic Cancer Treated by Concurrent Chemoradiotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(15):6569-73. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.15.6569. PMID: 26434876.
66. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018 Jan;12(1):3-20. doi: 10.1002/1878-0261.12155. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29124875; PMCID: PMC5748484.
67. Álamo JM, Marín LM, Suárez G, Bernal C, Serrano J, Barrera L, Gómez MA, Muntané J, Padillo FJ. Improving outcomes in pancreatic cancer: key points in perioperative management. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 21;20(39):14237-45. doi: 10.3748/wjg.v20.i39.14237. PMID: 25339810; PMCID: PMC4202352.
68. Garrido-Laguna I, Hidalgo M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Jun;12(6):319-34. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.53. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25824606.
69. Sabater L, Cugat E, Serrablo A, Suárez-Artacho G, Diez-Valladares L, Santoyo-Santoyo J, Martín-Pérez E, Ausania F, López-Ben S, Jover-Navalon JM, Garcés-Albir M, García-Domingo MI, Serradilla M, Pérez-Aguirre E, Sánchez-Pérez B, Di Martino M, Senra-Del-Rio P, Falgueras-Verdaguer L, Carabias A, Gómez-Mateo MC, Ferrándiz A, Dorcaratto D, Muñoz-Forner E, Fondevila C, Padillo J. Does the Artery-first Approach Improve the Rate of R0 Resection in Pancreatoduodenectomy?: A Multicenter, Randomized,

Controlled Trial. *Ann Surg.* 2019 Nov;270(5):738-746. doi: 10.1097/SLA.0000000000003535. PMID: 31498183.

70. National Cancer Institute. Cancer Staging. 2015. Accessed at <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging> on July 25, 2023.
71. American Joint Committee on Cancer. Exocrine Pancreas. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017:337
72. Isaji S, Mizuno S, Windsor JA, et al. International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology.* 2018 Jan;18(1):2-11. doi: 10.1016/j.pan.2017.11.011. Epub 2017 Nov 22.
73. WHO Classification of Tumours. 5th Edition. Digestive System tumours. Tumours of the pancreas. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Jun 2019, pag 295-370.
74. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2016 Jul 2;388(10039):73-85. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00141-0. Epub 2016 Jan 30. PMID: 26830752.
75. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Büchler MW; European Study Group for Pancreatic Cancer. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2001 Nov 10;358(9293):1576-85. doi: 10.1016/s0140-6736(01)06651-x. PMID: 11716884.
76. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gütberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007 Jan 17;297(3):267-77. doi: 10.1001/jama.297.3.267. PMID: 17227978.
77. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wente MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Oláh A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Büchler MW; European Study Group for Pancreatic Cancer. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid

vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Sep 8;304(10):1073-81. doi: 10.1001/jama.2010.1275. PMID: 20823433.

78. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, Faluyi O, O'Reilly DA, Cunningham D, Wadsley J, Darby S, Meyer T, Gillmore R, Anthony A, Lind P, Glimelius B, Falk S, Izbicki JR, Middleton GW, Cummins S, Ross PJ, Wasan H, McDonald A, Crosby T, Ma YT, Patel K, Sherriff D, Soomal R, Borg D, Sothi S, Hammel P, Hackert T, Jackson R, Büchler MW; European Study Group for Pancreatic Cancer. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Mar 11;389(10073):1011-1024. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32409-6. Epub 2017 Jan 25. PMID: 28129987.
79. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, Choné L, Francois E, Artru P, Biagi JJ, Lecomte T, Assenat E, Faroux R, Ychou M, Volet J, Sauvanet A, Breysacher G, Di Fiore F, Cripps C, Kavan P, Texereau P, Bouhier-Leporrier K, Khemissa-Akouz F, Legoux JL, Juzyna B, Gourgou S, O'Callaghan CJ, Jouffroy-Zeller C, Rat P, Malka D, Castan F, Bachet JB; Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Dec 20;379(25):2395-2406. doi: 10.1056/NEJMoa1809775. PMID: 30575490.
80. Murphy JE, Wo JY, Ryan DP, Clark JW, Jiang W, Yeap BY, Drapek LC, Ly L, Baglini CV, Blaszkowsky LS, Ferrone CR, Parikh AR, Weekes CD, Nipp RD, Kwak EL, Allen JN, Corcoran RB, Ting DT, Faris JE, Zhu AX, Goyal L, Berger DL, Qadan M, Lillemoe KD, Talele N, Jain RK, DeLaney TF, Duda DG, Boucher Y, Fernández-Del Castillo C, Hong TS. Total Neoadjuvant Therapy With FOLFIRINOX in Combination With Losartan Followed by Chemoradiotherapy for Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2019 Jul 1;5(7):1020-1027. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.0892. PMID: 31145418; PMCID: PMC6547247.
81. Janssen QP, Buettner S, Suker M, Beumer BR, Addeo P, Bachellier P, Bahary N, Bekaii-Saab T, Bali MA, Besselink MG, Boone BA, Chau I, Clarke S, Dillhoff M, El-Rayes BF, Frakes JM, Grose D, Hosein PJ, Jamieson NB, Javed AA, Khan K, Kim KP, Kim SC, Kim SS, Ko AH, Lacy J, Margonis GA, McCarter MD,

McKay CJ, Mellon EA, Moorcraft SY, Okada KI, Paniccia A, Parikh PJ, Peters NA, Rabl H, Samra J, Tinchon C, van Tienhoven G, van Veldhuisen E, Wang-Gillam A, Weiss MJ, Wilmink JW, Yamaue H, Homs MYV, van Eijck CHJ, Katz MHG, Groot Koerkamp B. Neoadjuvant FOLFIRINOX in Patients With Borderline Resectable Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Patient-Level Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2019 Aug 1;111(8):782-794. doi: 10.1093/jnci/djz073. PMID: 31086963; PMCID: PMC6695305.

82. Sabater L, Muñoz E, Roselló S, Dorcaratto D, Garcés-Albir M, Huerta M, Roda D, Gómez-Mateo MC, Ferrández-Izquierdo A, Darder A, Cervantes A. Borderline resectable pancreatic cancer. Challenges and controversies. *Cancer Treat Rev.* 2018 Jul;68:124-135. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.06.006. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29957372.
83. Goldstein D, El-Maraghi RH, Hammel P, Heinemann V, Kunzmann V, Sastre J, Scheithauer W, Siena S, Tabernero J, Teixeira L, Tortora G, Van Laethem JL, Young R, Penenberg DN, Lu B, Romano A, Von Hoff DD. nab-Paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: long-term survival from a phase III trial. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Jan 31;107(2):dju413. doi: 10.1093/jnci/dju413. PMID: 25638248.
84. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med.* 2013 Oct 31;369(18):1691-703. doi: 10.1056/NEJMoa1304369. Epub 2013 Oct 16. PMID: 24131140; PMCID: PMC4631139.
85. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pancreas/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-por-etapas.html> (Etapas del cáncer de páncreas. Consultado el 16/03/2023)
86. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann Oncol.* 2014 Aug;25(8):1650-6. doi: 10.1093/annonc/mdu138. Epub 2014 Apr 23. PMID: 24759568.
87. Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Sep;5(5):402-18. doi: 10.1016/j.apsb.2015.07.005. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26579471; PMCID: PMC4629446.
88. Stoletov K, Beatty PH, Lewis JD. Novel therapeutic targets for cancer metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2020 Feb;20(2):97-109. doi: 10.1080/14737140.2020.1718496. Epub 2020 Jan 30. PMID:

31997674.

89. Teeuwssen M, Fodde R. Cell Heterogeneity and Phenotypic Plasticity in Metastasis Formation: The Case of Colon Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 14;11(9):1368. doi: 10.3390/cancers11091368. Erratum in: *Cancers (Basel)*. 2020 May 28;12(6): PMID: 31540068; PMCID: PMC6770401.
90. Yang X, Liang X, Zheng M, Tang Y. Cellular Phenotype Plasticity in Cancer Dormancy and Metastasis. *Front Oncol*. 2018 Nov 5;8:505. doi: 10.3389/fonc.2018.00505. PMID: 30456206; PMCID: PMC6230580.
91. Fitzgerald W, Freeman ML, Lederman MM, Vasilieva E, Romero R, Margolis L. A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles. *Sci Rep*. 2018 Jun 12;8(1):8973. doi: 10.1038/s41598-018-27190-x. Erratum in: *Sci Rep*. 2020 Oct 29;10(1):18935. PMID: 29895824; PMCID: PMC5997670.
92. Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med*. 2018 Aug;12(4):361-373. doi: 10.1007/s11684-018-0656-6. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30043221; PMCID: PMC6186394.
93. Akhtar M, Haider A, Rashid S, Al-Nabet ADMH. Paget's "Seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv Anat Pathol*. 2019 Jan;26(1):69-74. doi: 10.1097/PAP.0000000000000219. PMID: 30339548.
94. Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*. 2013 Dec;4(12):2171-85. doi: 10.18632/oncotarget.1426. PMID: 24259307; PMCID: PMC3926818.
95. Pollard JW. Defining Metastatic Cell Latency. *N Engl J Med*. 2016 Jul 21;375(3):280-2. doi: 10.1056/NEJMcibr1606716. PMID: 27468066; PMCID: PMC5024542.
96. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016 Jan 21;529(7586):298-306. doi: 10.1038/nature17038. PMID: 26791720; PMCID: PMC5029466.
97. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):670-691. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.037. PMID: 28187288; PMCID: PMC5308465.
98. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*. 2011 Apr;21(2):139-46. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.01.002. Epub 2011 Jan 18. PMID: 21251983.

99. Chin AR, Wang SE. Cancer Tills the Premetastatic Field: Mechanistic Basis and Clinical Implications. *Clin Cancer Res.* 2016 Aug 1;22(15):3725-33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0028. Epub 2016 Jun 1. PMID: 27252414; PMCID: PMC4970897.
100. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, Psaila B, Kaplan RN, Bromberg JF, Kang Y, Bissell MJ, Cox TR, Giaccia AJ, Ertler JT, Hiratsuka S, Ghajar CM, Lyden D. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer.* 2017 May;17(5):302-317. doi: 10.1038/nrc.2017.6. Epub 2017 Mar 17. PMID: 28303905.
101. Liu Y, Cao X. Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell.* 2016 Nov 14;30(5):668-681. doi: 10.1016/j.ccell.2016.09.011. PMID: 27846389.
102. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol.* 2015 Feb;15(2):73-86. doi: 10.1038/nri3789. PMID: 25614318; PMCID: PMC4470277.
103. Law AM, Lim E, Ormandy CJ, Gallego-Ortega D. The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocr Relat Cancer.* 2017 Apr;24(4):R123-R144. doi: 10.1530/ERC-16-0404. Epub 2017 Feb 13. Erratum in: *Endocr Relat Cancer.* 2017 Jul;24(7):X1. PMID: 28193698; PMCID: PMC5425956.
104. Aguado BA, Bushnell GG, Rao SS, Jeruss JS, Shea LD. Engineering the pre-metastatic niche. *Nat Biomed Eng.* 2017;1:0077. doi: 10.1038/s41551-017-0077. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28989814; PMCID: PMC5628747.
105. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Ruger R. The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics.* 2017 Jan 2;14(1):1-15. doi: 10.21873/cgp.20015. PMID: 28031234; PMCID: PMC5267497.
106. Li W, Li C, Zhou T, Liu X, Liu X, Li X, Chen D. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer.* 2017 Aug 29;16(1):145. doi: 10.1186/s12943-017-0706-8. PMID: 28851367; PMCID: PMC5576100.
107. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles.* 2014 Aug 4;3. doi: 10.3402/jev.v3.24641. PMID: 25143819; PMCID: PMC4122821.
108. Rashed MH, Bayraktar E, K Helal G, Abd-Ellah MF, Amero P, Chavez-Reyes A, Rodriguez-Aguayo C. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 2;18(3):538.

doi: 10.3390/ijms18030538. PMID: 28257101; PMCID: PMC5372554.

109. Soung YH, Nguyen T, Cao H, Lee J, Chung J. Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep.* 2016 Jan;49(1):18-25. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.1.239. PMID: 26592936; PMCID: PMC4914208.
110. Costa JL, Schmitt FC. Liquid Biopsy: A New Tool in Oncology. *Acta Cytol.* 2019;63(6):448. doi: 10.1159/000501355. Epub 2019 Jul 2. PMID: 31266005.
111. Qi ZH, Xu HX, Zhang SR, Xu JZ, Li S, Gao HL, Jin W, Wang WQ, Wu CT, Ni QX, Yu XJ, Liu L. The Significance of Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer. *J Cancer.* 2018 Sep 8;9(18):3417-3426. doi: 10.7150/jca.24591. PMID: 30271504; PMCID: PMC6160675.
112. Strati A, Markou A, Kyriakopoulou E, Lianidou E. Detection and Molecular Characterization of Circulating Tumour Cells: Challenges for the Clinical Setting. *Cancers (Basel).* 2023 Apr 6;15(7):2185. doi: 10.3390/cancers15072185. PMID: 37046848; PMCID: PMC10092977.
113. Zhang Z, Wu H, Chong W, Shang L, Jing C, Li L. Liquid biopsy in gastric cancer: predictive and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis.* 2022 Oct 27;13(10):903. doi: 10.1038/s41419-022-05350-2. PMID: 36302755; PMCID: PMC9613678.
114. Zhang W, Xia W, Lv Z, Ni C, Xin Y, Yang L. Liquid Biopsy for Cancer: Circulating Tumor Cells, Circulating Free DNA or Exosomes? *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(2):755-768. doi: 10.1159/000458736. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28214887.
115. Rushton AJ, Nteliopoulos G, Shaw JA, Coombes RC. A Review of Circulating Tumour Cell Enrichment Technologies. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 26;13(5):970. doi: 10.3390/cancers13050970. PMID: 33652649; PMCID: PMC7956528.
116. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019 Jul;16(7):409-424. doi: 10.1038/s41571-019-0187-3. PMID: 30796368.
117. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic - implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021 May;18(5):297-312. doi: 10.1038/s41571-020-00457-x. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33473219.

118. Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Nov;71(22):4393-402. doi: 10.1007/s00018-014-1693-1. Epub 2014 Aug 8. PMID: 25103341.
119. Ju S, Chen C, Zhang J, Xu L, Zhang X, Li Z, Chen Y, Zhou J, Ji F, Wang L. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark Res.* 2022 Aug 13;10(1):58. doi: 10.1186/s40364-022-00403-2. PMID: 35962400; PMCID: PMC9375360.
120. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):39-51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014. PMID: 20371344; PMCID: PMC4994190.
121. Rejniak KA. Investigating dynamical deformations of tumor cells in circulation: predictions from a theoretical model. *Front Oncol.* 2012 Sep 18;2:111. doi: 10.3389/fonc.2012.00111. PMID: 23024961; PMCID: PMC3444760.
122. Mazel M, Jacot W, Pantel K, Bartkowiak K, Topart D, Cayrefourcq L, Rossille D, Maudelonde T, Fest T, Alix-Panabières C. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol.* 2015 Nov;9(9):1773-82. doi: 10.1016/j.molonc.2015.05.009. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26093818; PMCID: PMC5528721.
123. Oliveira-Costa JP, de Carvalho AF, da Silveira da GG, Amaya P, Wu Y, Park KJ, Gigliola MP, Lustberg M, Buim ME, Ferreira EN, Kowalski LP, Chalmers JJ, Soares FA, Carraro DM, Ribeiro-Silva A. Gene expression patterns through oral squamous cell carcinoma development: PD-L1 expression in primary tumor and circulating tumor cells. *Oncotarget.* 2015 Aug 28;6(25):20902-20. doi: 10.18632/oncotarget.3939. PMID: 26041877; PMCID: PMC4673238.
124. Wang X, Sun Q, Liu Q, Wang C, Yao R, Wang Y. CTC immune escape mediated by PD-L1. *Med Hypotheses.* 2016 Aug;93:138-9. doi: 10.1016/j.mehy.2016.05.022. Epub 2016 May 21. PMID: 27372873.
125. Steinert G, Schölch S, Niemiets T, Iwata N, García SA, Behrens B, Voigt A, Kloor M, Benner A, Bork U, Rahbari NN, Büchler MW, Stoecklein NH, Weitz J, Koch M. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res.* 2014 Mar 15;74(6):1694-704. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1885. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24599131.
126. Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, Krol I, Gkountela S, Landin J, Scheidmann MC, Donato C, Scherrer

- R, Singer J, Beisel C, Kurzeder C, Heinzelmann-Schwarz V, Rochlitz C, Weber WP, Beerenwinkel N, Aceto N. Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*. 2019 Feb;566(7745):553-557. doi: 10.1038/s41586-019-0915-y. Epub 2019 Feb 6. PMID: 30728496.
127. Deutsch TM, Riethdorf S, Fremd C, Feisst M, Nees J, Fischer C, Hartkopf AD, Pantel K, Trumpp A, Schütz F, Schneeweiss A, Wallwiener M. HER2-targeted therapy influences CTC status in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2020 Jul;182(1):127-136. doi: 10.1007/s10549-020-05687-2. Epub 2020 May 20. PMID: 32436146; PMCID: PMC7274999.
128. Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, Mack B, Baldus SA, Hoya V, Pietsch JM, Panagiotidou P, Raba K, Vay C, Vallböhmer D, Harréus U, Knoefel WT, Stoecklein NH, Gires O. Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*. 2014 Oct 9;33(41):4904-15. doi: 10.1038/onc.2013.441. Epub 2013 Oct 21. PMID: 24141784.
129. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, von Ahsen O. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012 May 16;12:178. doi: 10.1186/1471-2407-12-178. PMID: 22591372; PMCID: PMC3502112.
130. Harouaka RA, Nisic M, Zheng SY. Circulating tumor cell enrichment based on physical properties. *J Lab Autom*. 2013 Dec;18(6):455-68. doi: 10.1177/2211068213494391. Epub 2013 Jul 5. PMID: 23832928; PMCID: PMC3830628.
131. Gascoyne PR, Shim S, Noshari J, Becker FF, Stemke-Hale K. Correlations between the dielectric properties and exterior morphology of cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation. *Electrophoresis*. 2013 Apr;34(7):1042-50. doi: 10.1002/elps.201200496. PMID: 23172680; PMCID: PMC3754903.
132. Amintas S, Bedel A, Moreau-Gaudry F, Boutin J, Buscail L, Merlio JP, Vendrely V, Dabernat S, Buscail E. Circulating Tumor Cell Clusters: United We Stand Divided We Fall. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 10;21(7):2653. doi: 10.3390/ijms21072653. PMID: 32290245; PMCID: PMC7177734.
133. Fabisiewicz A, Grzybowska E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med Oncol*. 2017 Jan;34(1):12. doi: 10.1007/s12032-016-0875-0. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28012133.
134. Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters

- and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends Cancer*. 2015 Sep;1(1):44-52. doi: 10.1016/j.trecan.2015.07.006. Epub 2015 Sep 28. PMID: 28741562.
135. Hong Y, Fang F, Zhang Q. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol*. 2016 Dec;49(6):2206-2216. doi: 10.3892/ijo.2016.3747. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27779656; PMCID: PMC5117994.
136. Rhim AD, Thege FI, Santana SM, Lannin TB, Saha TN, Tsai S, Maggs LR, Kochman ML, Ginsberg GG, Lieb JG, Chandrasekhara V, Drebin JA, Ahmad N, Yang YX, Kirby BJ, Stanger BZ. Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology*. 2014 Mar;146(3):647-51. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.007. Epub 2013 Dec 13. PMID: 24333829; PMCID: PMC4514438.
137. Kulemann B, Pitman MB, Liss AS, Valsangkar N, Fernández-Del Castillo C, Lillemoe KD, Hoepfner J, Mino-Kenudson M, Warshaw AL, Thayer SP. Circulating tumor cells found in patients with localized and advanced pancreatic cancer. *Pancreas*. 2015 May;44(4):547-50. doi: 10.1097/MPA.0000000000000324. PMID: 25822154.
138. Zhang Y, Wang F, Ning N, Chen Q, Yang Z, Guo Y, Xu D, Zhang D, Zhan T, Cui W. Patterns of circulating tumor cells identified by CEP8, CK and CD45 in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):1228-33. doi: 10.1002/ijc.29070. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25042121.
139. Sikora K, Bedin C, Vicentini C, Malpeli G, D'Angelo E, Sperandio N, Lawlor RT, Bassi C, Tortora G, Nitti D, Agostini M, Fassan M, Scarpa A. Evaluation of cell-free DNA as a biomarker for pancreatic malignancies. *Int J Biol Markers*. 2015 Feb 24;30(1):e136-41. doi: 10.5301/jbm.5000088. PMID: 24832178.
140. Zill OA, Greene C, Sebisano D, Siew LM, Leng J, Vu M, Hendifar AE, Wang Z, Atreya CE, Kelley RK, Van Loon K, Ko AH, Tempero MA, Bivona TG, Munster PN, Talasz A, Collisson EA. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov*. 2015 Oct;5(10):1040-8. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0274. Epub 2015 Jun 24. PMID: 26109333; PMCID: PMC4592417.
141. Smyth TJ, Redzic JS, Graner MW, Anchordoquy TJ. Examination of the specificity of tumor cell derived exosomes with tumor cells in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1838(11):2954-65. doi: 10.1016/j.bbame.2014.07.026. Epub 2014 Aug 4. PMID: 25102470; PMCID: PMC5657189.

142. Okubo K, Uenosono Y, Arigami T, Mataka Y, Matsushita D, Yanagita S, Kurahara H, Sakoda M, Kijima Y, Maemura K, Natsugoe S. Clinical impact of circulating tumor cells and therapy response in pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2017 Jun;43(6):1050-1055. doi: 10.1016/j.ejso.2017.01.241. Epub 2017 Feb 12. Erratum in: *Eur J Surg Oncol*. 2018 Mar 28;: PMID: 28233633.
143. Poruk KE, Valero V 3rd, Saunders T, Blackford AL, Griffin JF, Poling J, Hruban RH, Anders RA, Herman J, Zheng L, Rasheed ZA, Laheru DA, Ahuja N, Weiss MJ, Cameron JL, Goggins M, Iacobuzio-Donahue CA, Wood LD, Wolfgang CL. Circulating Tumor Cell Phenotype Predicts Recurrence and Survival in Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2016 Dec;264(6):1073-1081. doi: 10.1097/SLA.0000000000001600. PMID: 26756760; PMCID: PMC4936958.
144. Ren C, Han C, Zhang J, He P, Wang D, Wang B, Zhao P, Zhao X. Detection of apoptotic circulating tumor cells in advanced pancreatic cancer following 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Biol Ther*. 2011 Oct 15;12(8):700-6. doi: 10.4161/cbt.12.8.15960. Epub 2011 Oct 15. PMID: 21811100.
145. Berger AW, Schwerdel D, Ettrich TJ, Hann A, Schmidt SA, Kleger A, Marienfeld R, Seufferlein T. Targeted deep sequencing of circulating tumor DNA in metastatic pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2017 Dec 16;9(2):2076-2085. doi: 10.18632/oncotarget.23330. PMID: 29416754; PMCID: PMC5788622.
146. Pietrasz D, Pécuchet N, Garlan F, Didelot A, Dubreuil O, Doat S, Imbert-Bismut F, Karoui M, Vaillant JC, Taly V, Laurent-Puig P, Bachet JB. Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker. *Clin Cancer Res*. 2017 Jan 1;23(1):116-123. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0806. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27993964.
147. Singh N, Gupta S, Pandey RM, Chauhan SS, Saraya A. High levels of cell-free circulating nucleic acids in pancreatic cancer are associated with vascular encasement, metastasis and poor survival. *Cancer Invest*. 2015 Mar;33(3):78-85. doi: 10.3109/07357907.2014.1001894. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25647443.
148. Catenacci DV, Chapman CG, Xu P, Koons A, Konda VJ, Siddiqui UD, Waxman I. Acquisition of Portal Venous Circulating Tumor Cells From Patients With Pancreaticobiliary Cancers by Endoscopic Ultrasound. *Gastroenterology*. 2015 Dec;149(7):1794-1803.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.050. Epub 2015 Sep 2. PMID: 26341722; PMCID: PMC4985007.
149. Bissolati M, Sandri MT, Burtulo G, Zorzino L, Balzano G, Braga M. Portal vein-circulating tumor cells

predict liver metastases in patients with resectable pancreatic cancer. *Tumour Biol.* 2015 Feb;36(2):991-6. doi: 10.1007/s13277-014-2716-0. Epub 2014 Oct 16. PMID: 25318603.

150. Gall TM, Jacob J, Frampton AE, Krell J, Kyriakides C, Castellano L, Stebbing J, Jiao LR. Reduced dissemination of circulating tumor cells with no-touch isolation surgical technique in patients with pancreatic cancer. *JAMA Surg.* 2014 May;149(5):482-5. doi: 10.1001/jamasurg.2013.3643. PMID: 24599353.
151. Court CM, Ankeny JS, Sho S, Winograd P, Hou S, Song M, Wainberg ZA, Girgis MD, Graeber TG, Agopian VG, Tseng HR, Tomlinson JS. Circulating Tumor Cells Predict Occult Metastatic Disease and Prognosis in Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018 Apr;25(4):1000-1008. doi: 10.1245/s10434-017-6290-8. Epub 2018 Feb 13. PMID: 29442211; PMCID: PMC5896564.
152. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, Becker A, Hoshino A, Mark MT, Molina H, Xiang J, Zhang T, Theilen TM, García-Santos G, Williams C, Ararso Y, Huang Y, Rodrigues G, Shen TL, Labori KJ, Lothe IM, Kure EH, Hernandez J, Doussot A, Ebbesen SH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Schwartz RE, Matei I, Peinado H, Stanger BZ, Bromberg J, Lyden D. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015 Jun;17(6):816-26. doi: 10.1038/ncb3169. Epub 2015 May 18. PMID: 25985394; PMCID: PMC5769922.
153. Paoletti C, Hayes DF. Circulating Tumor Cells. In: Stearns V, editor. *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 235–58. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-22909-6_10.
154. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, Brannigan BW, Kapur R, Stott SL, Shioda T, Ramaswamy S, Ting DT, Lin CP, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell.* 2014 Aug 28;158(5):1110-1122. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013. PMID: 25171411; PMCID: PMC4149753.
155. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, Priest LJ, Greystoke A, Zhou C, Morris K, Ward T, Blackhall FH, Dive C. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012 Feb

- 10;30(5):525-32. doi: 10.1200/JCO.2010.33.3716. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22253462.
156. Bukowska DM, Chew AL, Huynh E, Kashani I, Wan SL, Wan PM, Chen FK. Semi-automated identification of cones in the human retina using circle Hough transform. *Biomed Opt Express*. 2015 Nov 3;6(12):4676-93. doi: 10.1364/BOE.6.004676. PMID: 26713186; PMCID: PMC4679246.
157. Acharya V, Kumar P. Identification and red blood cell automated counting from blood smear images using computer-aided system. *Med Biol Eng Comput*. 2018 Mar;56(3):483-489. doi: 10.1007/s11517-017-1708-9. Epub 2017 Aug 17. PMID: 28815426.
158. Zhang L, Ye Y, Dhar R, Deng J, Tang H. Estimating Dynamic Cellular Morphological Properties via the Combination of the RTCA System and a Hough-Transform-Based Algorithm. *Cells*. 2019 Oct 21;8(10):1287. doi: 10.3390/cells8101287. PMID: 31640200; PMCID: PMC6829879.
159. Matas J, Galambos C, Kittler J. Robust Detection of Lines Using the Progressive Probabilistic Hough Transform. *Comput Vis Image Underst [Internet]*. 2000;78(1):119–37. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1077314299908317>
160. Xu Z, Shin B-S, Klette R. Closed form line-segment extraction using the Hough transform. *Pattern Recognit [Internet]*. 2015;48(12):4012–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031320315002307>
161. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA. Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Sep;15(9):541-563. doi: 10.1038/s41571-018-0035-x. PMID: 29784926.
162. Smith R, Najarian K, Ward K. A hierarchical method based on active shape models and directed Hough transform for segmentation of noisy biomedical images; application in segmentation of pelvic X-ray images. *BMC Med Inform Decis Mak [Internet]*. 2009;9(1):S2. Available from: <https://doi.org/10.1186/1472-6947-9-S1-S2>
163. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6897-904. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0378. PMID: 15501967.
164. Verbeke CS, Gladhaug IP. Resection margin involvement and tumour origin in pancreatic head cancer.

Br J Surg. 2012 Aug;99(8):1036-49. doi: 10.1002/bjs.8734. Epub 2012 Apr 20. PMID: 22517199.

165. Adsay NV, Basturk O, Saka B, Bagci P, Ozdemir D, Balci S, Sarmiento JM, Kooby DA, Staley C, Maithel SK, Everett R, Cheng JD, Thirabanjasak D, Weaver DW. Whipple made simple for surgical pathologists: orientation, dissection, and sampling of pancreaticoduodenectomy specimens for a more practical and accurate evaluation of pancreatic, distal common bile duct, and ampullary tumors. *Am J Surg Pathol*. 2014 Apr;38(4):480-93. doi: 10.1097/PAS.000000000000165. PMID: 24451278; PMCID: PMC4051141.
166. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W, Schumacher M. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Jun 1;86(11):829-35. doi: 10.1093/jnci/86.11.829. PMID: 8182763.
167. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*. 2012 Sep;24(3):69-71. PMID: 23638278; PMCID: PMC3576830.
168. Connors D, Allen J, Alvarez JD, Boyle J, Cristofanilli M, Hiller C, Keating S, Kelloff G, Leiman L, McCormack R, Merino D, Morgan E, Pantel K, Rolfo C, Serrano MJ, Pia Sanzone A, Schlange T, Sigman C, Stewart M. International liquid biopsy standardization alliance white paper. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020 Dec;156:103112. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103112. Epub 2020 Sep 30. PMID: 33035734.
169. Rolfo C, Cardona AF, Cristofanilli M, Paz-Ares L, Diaz Mochon JJ, Duran I, Raez LE, Russo A, Lorente JA, Malapelle U, Gil-Bazo I, Jantus-Lewintre E, Pauwels P, Mok T, Serrano MJ; ISLB. Challenges and opportunities of cfDNA analysis implementation in clinical practice: Perspective of the International Society of Liquid Biopsy (ISLB). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020 Jul;151:102978. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102978. Epub 2020 May 5. Erratum in: *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020 Oct;154:103058. PMID: 32428812.
170. Malapelle U, Pisapia P, Addeo A, Arrieta O, Bellosillo B, Cardona AF, Cristofanilli M, De Miguel-Perez D, Denninghoff V, Durán I, Jantus-Lewintre E, Nuzzo PV, O'Byrne K, Pauwels P, Pickering EM, Raez LE, Russo A, Serrano MJ, Gandara DR, Troncone G, Rolfo C. Liquid biopsy from research to clinical practice: focus on non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021 Nov;21(11):1165-1178. doi: 10.1080/14737159.2021.1985468. Epub 2021 Oct 11. PMID: 34570988.

171. Arnoletti JP, Fanaian N, Reza J, Sause R, Almodovar AJ, Srivastava M, Patel S, Veldhuis PP, Griffith E, Shao YP, Zhu X, Litherland SA. Pancreatic and bile duct cancer circulating tumor cells (CTC) form immune-resistant multi-cell type clusters in the portal venous circulation. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(10):887-897. doi: 10.1080/15384047.2018.1480292. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30067440; PMCID: PMC6300340.
172. Lai CH, Chang YC. Microfluidic Capture and Multiplex Immunofluorescence of Circulating Tumor Cells to Identify Cancer of Origin. *Methods Mol Biol.* 2017;1634:1-19. doi: 10.1007/978-1-4939-7144-2_1. PMID: 28819837.
173. Yap TA, Lorente D, Omlin A, Olmos D, de Bono JS. Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker. *Clin Cancer Res.* 2014 May 15;20(10):2553-68. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2664. PMID: 24831278.
174. Song BG, Kwon W, Kim H, Lee EM, Han YM, Kim H, Byun Y, Lee KB, Lee KH, Lee KT, Lee JK, Jang JY, Park JK. Detection of Circulating Tumor Cells in Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Prospective Evaluation as a Prognostic Marker. *Front Oncol.* 2021 Feb 18;10:616440. doi: 10.3389/fonc.2020.616440. PMID: 33680936; PMCID: PMC7930477.
175. Bausch D, Thomas S, Mino-Kenudson M, Fernández-del CC, Bauer TW, Williams M, Warshaw AL, Thayer SP, Kelly KA. Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 Jan 15;17(2):302-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0999. Epub 2010 Nov 23. PMID: 21098698; PMCID: PMC3044444.
176. Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Zoli W, Rigaud M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: characterization of cell subpopulations. *Ann Transl Med.* 2014 Nov;2(11):109. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.10.04. PMID: 25489583; PMCID: PMC4245517.
177. Arnoletti JP, Fanaian N, Reza J, Sause R, Almodovar AJ, Srivastava M, Patel S, Veldhuis PP, Griffith E, Shao YP, Zhu X, Litherland SA. Pancreatic and bile duct cancer circulating tumor cells (CTC) form immune-resistant multi-cell type clusters in the portal venous circulation. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(10):887-897. doi: 10.1080/15384047.2018.1480292. Epub 2018 Aug 1. PMID: 30067440; PMCID: PMC6300340.
178. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LW. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol.* 2016 Mar;10(3):395-407. doi: 10.1016/j.molonc.2015.12.002. Epub 2015 Dec 25. PMID: 26795350; PMCID: PMC5528971.

179. Agerbæk MØ, Bang-Christensen SR, Yang MH, Clausen TM, Pereira MA, Sharma S, Ditlev SB, Nielsen MA, Choudhary S, Gustavsson T, Sorensen PH, Meyer T, Propper D, Shamash J, Theander TG, Aicher A, Daugaard M, Heeschen C, Salanti A. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat Commun*. 2018 Aug 16;9(1):3279. doi: 10.1038/s41467-018-05793-2. Erratum in: *Nat Commun*. 2022 Jun 7;13(1):3285. PMID: 30115931; PMCID: PMC6095877.
180. Hugenschmidt H, Labori KJ, Borgen E, Brunborg C, Schirmer CB, Seeberg LT, Naume B, Wiedswang G. Preoperative CTC-Detection by CellSearch® Is Associated with Early Distant Metastasis and Impaired Survival in Resected Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 27;13(3):485. doi: 10.3390/cancers13030485. PMID: 33513877; PMCID: PMC7865868.
181. White MG, Lee A, Vicente D, Hall C, Kim MP, Katz MHG, Lee JE, Ikoma N, Lucci A, Tzeng CD. Measurement of Portal Vein Blood Circulating Tumor Cells is Safe and May Correlate With Outcomes in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2021 Aug;28(8):4615-4622. doi: 10.1245/s10434-020-09518-y. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33415562; PMCID: PMC8607961.
182. Buscail E, Alix-Panabières C, Quincy P, Cauvin T, Chauvet A, Degrandi O, Caumont C, Verdon S, Lamrissi I, Moranvillier I, Buscail C, Marty M, Laurent C, Vendrely V, Moreau-Gaudry F, Bedel A, Dabernat S, Chiche L. High Clinical Value of Liquid Biopsy to Detect Circulating Tumor Cells and Tumor Exosomes in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients Eligible for Up-Front Surgery. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 26;11(11):1656. doi: 10.3390/cancers11111656. PMID: 31717747; PMCID: PMC6895804.
183. Alva A, Friedlander T, Clark M, Huebner T, Daignault S, Hussain M, Lee C, Hafez K, Hollenbeck B, Weizer A, Premasekharan G, Tran T, Fu C, Ionescu-Zanetti C, Schwartz M, Fan A, Paris P. Circulating Tumor Cells as Potential Biomarkers in Bladder Cancer. *J Urol*. 2015 Sep;194(3):790-8. doi: 10.1016/j.juro.2015.02.2951. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25912492; PMCID: PMC5103704.
184. Ma Y, Luk A, Young FP, Lynch D, Chua W, Balakrishnar B, de Souza P, Becker TM. Droplet Digital PCR Based Androgen Receptor Variant 7 (AR-V7) Detection from Prostate Cancer Patient Blood Biopsies. *Int J Mol Sci*. 2016 Aug 4;17(8):1264. doi: 10.3390/ijms17081264. PMID: 27527157; PMCID: PMC5000662.

185. Rao Q, Zhang Q, Zheng C, Dai W, Zhang B, Ionescu-Zanetti C, Lin Z, Zhang L. Detection of circulating tumour cells in patients with epithelial ovarian cancer by a microfluidic system. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017 Sep 1;10(9):9599-9606. PMID: 31966837; PMCID: PMC6965958.
186. Sánchez-Lorencio MI, Ramirez P, Saenz L, Martínez Sánchez MV, De La Orden V, Mediero-Valeros B, Veganzones-De-Castro S, Baroja-Mazo A, Revilla Nuin B, Gonzalez MR, Cascales-Campos PA, Noguera-Velasco JA, Minguela A, Díaz-Rubio E, Pons JA, Parrilla P. Comparison of Two Types of Liquid Biopsies in Patients With Hepatocellular Carcinoma Awaiting Orthotopic Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2015 Nov;47(9):2639-42. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.10.003. PMID: 26680058.
187. Ramirez P, Sáenz L, Cascales-Campos PA, González Sánchez MR, Llàcer-Millán E, Sánchez-Lorencio MI, Díaz-Rubio E, De La Orden V, Mediero-Valeros B, Navarro JL, Revilla Nuin B, Baroja-Mazo A, Noguera-Velasco JA, Sánchez BF, de la Peña J, Pons-Miñano JA, Sánchez-Bueno F, Robles-Campos R, Parrilla P. Oncological Evaluation by Positron-emission Tomography, Circulating Tumor Cells and Alpha Fetoprotein in Patients With Hepatocellular Carcinoma on the Waiting List for Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2016 Nov;48(9):2962-2965. doi: 10.1016/j.transproceed.2016.07.035. PMID: 27932119.
188. Vilhav C, Engström C, Naredi P, Novotny A, Bourghardt-Fagman J, Iresjö BM, Asting AG, Lundholm K. Fractional uptake of circulating tumor cells into liver-lung compartments during curative resection of periampullary cancer. *Oncol Lett*. 2018 Nov;16(5):6331-6338. doi: 10.3892/ol.2018.9435. Epub 2018 Sep 12. PMID: 30405768; PMCID: PMC6202519.
189. Amado V, González-Rubio S, Zamora J, Alejandro R, Espejo-Cruz ML, Linares C, Sánchez-Frías M, García-Jurado G, Montero JL, Ciria R, Rodríguez-Perálvarez M, Ferrín G, De la Mata M. Clearance of Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma Undergoing Surgical Resection or Liver Transplantation. *Cancers (Basel)*. 2021 May 19;13(10):2476. doi: 10.3390/cancers13102476. PMID: 34069569; PMCID: PMC8160727.
190. Wu J, Raba K, Guglielmi R, Behrens B, Van Dalum G, Flügen G, Koch A, Patel S, Knoefel WT, Stoecklein NH, Neves RPL. Magnetic-Based Enrichment of Rare Cells from High Concentrated Blood Samples.

Cancers (Basel). 2020 Apr 10;12(4):933. doi: 10.3390/cancers12040933. PMID: 32290064; PMCID: PMC7225976.

191. Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, Wang H, Bolt-de Vries J, Biermann K, Kraan J, Lalmahomed Z, van Galen A, de Weerd V, van der Spoel P, Ramírez-Moreno R, Verhoef C, Ijzermans JN, Wang Y, Gratama JW, Foekens JA, Sleijfer S, Martens JW. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer*. 2013 Jul;133(1):130-41. doi: 10.1002/ijc.27987. Epub 2013 Feb 9. PMID: 23233388.
192. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, Hayes DF, Kapke G, Kumar P, Lee JSh, Liu MC, McCormack R, Mikulski S, Nagahara L, Pantel K, Pearson-White S, Punnoose EA, Roadcap LT, Schade AE, Scher HI, Sigman CC, Kelloff GJ. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med*. 2012 Jul 2;10:138. doi: 10.1186/1479-5876-10-138. PMID: 22747748; PMCID: PMC3478228.
193. Hendricks A, Dall K, Brandt B, Geisen R, Röder C, Schafmayer C, Becker T, Hinz S, Sebens S. Longitudinal Analysis of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer Patients by a Cytological and Molecular Approach: Feasibility and Clinical Application. *Front Oncol*. 2021 Jun 28;11:646885. doi: 10.3389/fonc.2021.646885. PMID: 34262858; PMCID: PMC8273730.
194. Chen J, Wang H, Zhou L, Liu Z, Tan X. A combination of circulating tumor cells and CA199 improves the diagnosis of pancreatic cancer. *J Clin Lab Anal*. 2022 May;36(5):e24341. doi: 10.1002/jcla.24341. Epub 2022 Mar 25. PMID: 35334495; PMCID: PMC9102772.
195. Cauley CE, Pitman MB, Zhou J, Perkins J, Kuleman B, Liss AS, Fernandez-Del Castillo C, Warshaw AL, Lillemoe KD, Thayer SP. Circulating Epithelial Cells in Patients with Pancreatic Lesions: Clinical and Pathologic Findings. *J Am Coll Surg*. 2015 Sep;221(3):699-707. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.05.014. Epub 2015 May 27. PMID: 26209458; PMCID: PMC4546900.
196. Tien YW, Kuo HC, Ho BI, Chang MC, Chang YT, Cheng MF, Chen HL, Liang TY, Wang CF, Huang CY, Shew JY, Chang YC, Lee EY, Lee WH. A High Circulating Tumor Cell Count in Portal Vein Predicts Liver Metastasis From Periampullary or Pancreatic Cancer: A High Portal Venous CTC Count Predicts Liver Metastases.

Medicine (Baltimore). 2016 Apr;95(16):e3407. doi: 10.1097/MD.0000000000003407. PMID: 27100430;

PMCID: PMC4845834.b 2015 May 27. PMID: 26209458; PMCID: PMC4546900.

ANEXOS

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/Dª: Jose Salas Turrents como secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de FISEVI. Fundación pública andaluza. Sevilla para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Impacto de la diseminación de las CTCs durante la duodenopancreatectomía cefálica en la aparición de metástasis y supervivencia en pacientes con tumores de páncreas y periampulares

Protocolo, Versión: 1
 HIP, Versión: 1
 CI, Versión: 1

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en SEVILLA a 21/12/2016

D/Dª. Jose Salas Turrents, como Secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío



Código Seguro De Verificación:	c5c566dd144ff24b01cf98ec93a3dadeb566fb97	Fecha	21/12/2016	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Jose Salas Turrents			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/c5c566dd144ff24b01cf98ec93a3dadeb566fb97	Página	1/2	

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 24/11/2016 y recogida en acta 13/2016 la propuesta del/de la Promotor/a FISEVI. Fundación pública andaluza. Sevilla, para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Impacto de la diseminación de las CTCs durante la duodenopancreatectomía cefálica en la aparición de metástasis y supervivencia en pacientes con tumores de páncreas y periampulares

Protocolo, Versión: 1
HIP, Versión: 1
CI, Versión: 1

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

Presidente/a

D/D^a. Víctor Sánchez Margalet

Vicepresidente/a

D/D^a. Dolores Jiménez Hernández

Secretario/a

D/D^a. Jose Salas Turrents

Vocales

D/D^a. Enrique Calderón Sandubete
D/D^a. Francisco Javier Bautista Paloma
D/D^a. Gabriel Ramírez Soto
D/D^a. Carlos García Pérez
D/D^a. Juan Ramón Lacalle Remigio
D/D^a. Joaquin Quiralte Enriquez
D/D^a. Cristina Pichardo Guerrero
D/D^a. Javier Vitorica Fernandez
D/D^a. Juan Carlos Gomez Rosado
D/D^a. Luis Lopez Rodriguez
D/D^a. Enrique de Álava Casado
D/D^a. EVA MARIA DELGADO CUESTA
D/D^a. ANGELA CEJUDO LOPEZ
D/D^a. M LORENA LOPEZ CERERO
D/D^a. Amancio Carnero Moya
D/D^a. Manuel Ortega Calvo
D/D^a. LUIS GABRIEL LUQUE ROMERO
D/D^a. ANTONIO PÉREZ PÉREZ
D/D^a. María Pilar Guadix

Que dicho Comité, está constituido y actua de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Lo que firmo en SEVILLA a 21/12/2016



Código Seguro De Verificación:	c5c566dd144ff24b01cf98ec93a3dadeb566fb97	Fecha	21/12/2016	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Jose Salas Turrents			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/c5c566dd144ff24b01cf98ec93a3dadeb566fb97	Página	2/2	

ANEXO II. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

CETUPANC

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado *“Impacto de la diseminación de las CTCs (Células Tumorales Circulantes) durante la duodenopancreatectomía cefálica en la aparición de metástasis y supervivencia en pacientes con tumores de páncreas y periampulares”*, que está siendo realizado y coordinado por el Dr. Javier Padillo Ruiz como investigador principal del proyecto, del Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla) y en su Hospital por el Dr.

.....
El estudio va a llevarse a cabo en diferentes centros de ámbito nacional y ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de los Centros participantes.

Antecedentes

El tratamiento quirúrgico constituye el mejor tratamiento para los pacientes que, como usted, tienen tumores pancreáticos y periampulares que son extirpables. Desde el punto de vista técnico, evitar la diseminación tumoral durante la cirugía y obtener unos márgenes quirúrgicos libres de enfermedad son unas de las mayores dificultades de esta cirugía y se consideran de una importancia capital para conseguir buenos resultados.

La intervención quirúrgica que se le va a realizar se denomina duodenopancreatectomía cefálica. Consiste en la extirpación de la cabeza pancreática junto a otras estructuras anatómicas que por su cercanía a la cabeza del páncreas se incluyen necesariamente en la pieza quirúrgica: antro gástrico, duodeno, parte del yeyuno, cabeza pancreática, vía biliar y vesícula biliar. Existen variaciones de la técnica quirúrgica diseñadas con intención de ampliar los márgenes de resección o bordes de sección y reducir la diseminación de las células tumorales. Las dos técnicas que se emplean actualmente por la mayoría de los grupos especializados en la resección del cáncer de páncreas son la técnica de “no tocar” y el abordaje inicial de la arteria mesentérica superior (AMS). La diferencia entre las dos técnicas quirúrgicas que se quieren estudiar estriba en que la extirpación del tumor se realiza con diferentes ángulos de ataque de la zona anatómica.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Valorar si es posible mejorar la técnica quirúrgica de la extirpación de la cabeza pancreática en cuanto a los resultados oncológicos, sin aumentar las posibles complicaciones postoperatorias, para ello el objetivo principal consiste en medir las células del tumor que pueden liberarse a la sangre en el acto de la cirugía y compararlas entre las dos técnicas, para intentar diferenciar cuál puede ser más beneficiosa de cara al resultado final de la cirugía.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticado de adenocarcinoma de páncreas o periampular y se le tiene que realizar una duodenopancreatectomía cefálica. El único modo de confirmar qué técnica quirúrgica es mejor, es hacer dos grupos de pacientes de parecidas características y a unos realizar el abordaje de “no-tocar” y a otros el de la arteria mesentérica superior y comparar la evolución de ambos grupos. Para ello, durante la intervención quirúrgica se tomarán hasta un máximo de 4 muestras sanguíneas mediante punción de la vena porta.

Por lo demás, a todos los pacientes se les tratará igualmente y llevarán los mismos cuidados perioperatorios.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para aleatorizar o asignar al azar (como tirar una moneda al aire) la técnica de abordaje quirúrgico que se realizará en su intervención y utilizar con fines científicos los resultados del procedimiento que se le realice a Vd. Su cirujano no sabrá qué intervención debe realizar hasta el momento previo a la entrada en el quirófano, durante la intervención quirúrgica se tomarán hasta un máximo de 4 muestras sanguíneas mediante punción de la vena porta.

La participación en el presente ensayo clínico no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

Se le realizará un seguimiento dentro del ensayo clínico de hasta 36 meses.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

No se prevé ningún riesgo adicional para usted ya que ambas técnicas quirúrgicas se utilizan habitualmente. No obstante, debe conocer los riesgos derivados de la punción de la vena porta para la obtención de las 4 muestras de sangre:

- Hematoma en hilio hepático
- Trombosis portal o mesentérica superior
- Hemoperitoneo

El promotor del ensayo ha contratado un seguro de responsabilidad civil con la compañía aseguradora W.R. Berkley Europe AG, POLIZA Nº: 2015281, que le proporcionará la compensación e indemnización en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse en relación con su participación en el estudio, siempre que no sean consecuencia de la propia enfermedad que se estudia o de la evolución propia de su enfermedad.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o terapéutico para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes. Tampoco obtendrá ninguna compensación económica por participar en el estudio

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación y consulte con su familia antes de tomar ninguna decisión. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. en el teléfono

Confidencialidad

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad serán tratados con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación utilizando códigos disociados para mantenerla. Asimismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación. Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras de sangre obtenidas durante la investigación?

Las 4 muestras de sangre obtenidas, serán enviadas al IBIS (Instituto de Biomedicina de Sevilla) quienes se encargarán de su análisis y custodia. Las muestras serán destruidas al finalizar el estudio. Estas muestras serán siempre utilizadas con fines científicos en el marco de este ensayo clínico, Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: *“Impacto de la diseminación de las CTCs (Células Tumorales Circulantes) durante la duodenopancreatectomía cefálica en la aparición de metástasis y supervivencia en pacientes con tumores de páncreas y periampulares”.*

Investigador principal: Dr. Javier Padillo Ruiz, Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

Yo, he sido informado por el Dr., coordinador en el Hospital y colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado.

Declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera sin tener que dar explicaciones sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Mediante este acto Vd. consiente el uso de sus muestras en relación con este proyecto de investigación.: Si No

Doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha:

CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

Título del Proyecto: *“Impacto de la diseminación de las CTCs (Células Tumorales Circulantes) durante la duodenopancreatectomía cefálica en la aparición de metástasis y supervivencia en pacientes con tumores de páncreas y periampulares”.*

Investigador principal: Dr. Javier Padillo Ruiz, Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

Coordinador en el Hospital

Dr.

Yo (nombre y apellidos del testigo),

En relación a (nombre y apellidos del participante).....

Declaro que he sido testigo de que, al participante en relación al estudio arriba indicado:

- Se le ha leído la Hoja de Información que se me ha entregado.
- Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.
- Ha recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.
- Ha recibido suficiente información sobre el estudio.
- Comprende que su participación es voluntaria.
- Comprende que todos sus datos serán tratados confidencialmente.
- Ha comprendido que puede retirarse del estudio cuando quiera sin tener que dar explicaciones sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Mediante este acto ha consentido el uso de sus muestras en relación con este proyecto de investigación: Si No

Ha dado su conformidad para participar en este estudio:

Firma del testigo:

Firma del Investigador:

Fecha:

Fecha:

Anexo a la Hoja de Información al Paciente / Consentimiento Informado del Estudio Cetupanc - Información adicional sobre protección de datos desde el 25 de mayo de 2018.

A partir del 25 de mayo de 2018 es de plena aplicación la nueva legislación en la UE sobre datos personales, en concreto el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD). Por ello, es importante que conozca la siguiente información:

Además de los derechos que ya conoce (acceso, modificación, oposición y cancelación de datos) ahora también puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, diríjase al investigador principal del estudio. Le recordamos que los datos no se pueden eliminar, aunque deje de participar en el ensayo para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales y los requisitos de autorización de medicamentos. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho. Tanto el Centro como el Promotor son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, su información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud y por el

promotor para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado su consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables. Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos.

INFORME HISTOLÓGICO.

Título: Impacto de la diseminación de las células tumorales circulantes (CTCs) durante la duodenopancreatectomía cefálica en la aparición de metástasis y supervivencia en pacientes con tumores de páncreas y periampulares. (Estudio CETUPANC).



CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR

Tipo de pieza:

- Duodenopancreatectomía cefálica
- Duodenopancreatectomía total

Tamaño de Tumor (cm) ____ x ____ x ____

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

- Sólido
- Quístico
- Poliploide
- Otros

TIPO HISTOLÓGICO

- Adenocarcinoma ductal de páncreas
- Adenocarcinoma duodenal
- Adenocarcinoma de vía biliar
- Ampuloma

GRADO DE DIFERENCIACIÓN

- Bien diferenciado (G1)
- Moderadamente diferenciado (G2)
- Pobremente diferenciado (G3)
- Indiferenciado (G4)
- Otros

INVASIÓN

- Vascular
- Linfática
- Perineural

LOCALIZACIÓN Y EXTENSIÓN A TEJIDOS ADYACENTES

- Cabeza
- Cuerpo
- Proceso uncinado
- Ampolla
- Vía biliar

GRADO DE EXTENSIÓN

- No invasión (in situ): pTis
- Confinado al páncreas ≤ 2 cm de tamaño: pT1
- Confinado al páncreas > 2 cm de tamaño: pT2
- Invasión de estructuras adyacentes: pT3
- Invasión estómago, bazo, colon o grandes vaso: pT4

LESIONES PRENEOPLÁSICAS

- PanIN
- IPMN
- Otros

COMENTARIOS:

LESIONES NO NEOPLÁSICAS

- Obstrucción del ducto biliar
- Obstrucción del ducto pancreático
- Cálculos
- Pancreatitis
- Otros

MARGEN CIRCUNFERENCIAL POSTERIOR (arterial)

- Libre (> 1 mm)
- Afecto
 - Directa (tumor en contacto)
 - Por invasión vascular, linfática o perineural a ≤ 1 mm
 - Por metástasis ganglionar ≤ 1 mm
 - Tumor a ≤ 1 mm

MARGEN CIRCUNFERENCIAL MEDIAL (venoso)

- Libre (> 1 mm)
- Afecto
 - Directa (tumor en contacto)
 - Por invasión vascular, linfática o perineural a ≤ 1 mm
 - Por metástasis ganglionar ≤ 1 mm
 - Tumor a ≤ 1 mm

MARGEN BILIAR

- Libre
- Afecto

MARGEN PANCREÁTICO

- Libre
- Afecto

TIPO DE RESECCIÓN

- R0
- R1
- R2

ADENOPATÍAS METASTÁSICAS/AISLADAS (TOTAL)

- Nx
 - N0
 - N1
- TOTAL Aisladas _____ TOTAL Mtx _____

METÁSTASIS A DISTANCIA

- M0
- M1

ESTADÍO

- IA
- IB
- IIA
- IIB
- III
- IV

Fecha: ____/____/____

Firma: _____
(Del investigador)

“CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS”

Código de Protocolo: CETUPANC

“Impacto de la diseminación de las CTCs durante la duodenopancreatectomía cefálica en la aparición de metástasis y supervivencia en pacientes con tumores de páncreas y periampulares”

CENTRO: _____

CÓDIGO DEL CENTRO: _____

MÉDICO RESPONSABLE: _____

TELÉFONO: _____ E-MAIL: _____

CÓDIGO DEL PACIENTE: _____

VISITA DE SELECCIÓN

Fecha de la visita: ____ / ____ / ____

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Marque SI o NO (Si marca NO en cualquier respuesta el paciente debe ser excluido del estudio)

Pacientes mayores de 18 años, con adenocarcinomas de páncreas y tumores periampulares potencialmente resecables mediante duodenopancreatectomía cefálica o duodenopancreatectomía total indicada intraoperatoriamente por motivos técnicos, que acepten voluntariamente participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
--	-----------------------------	-----------------------------

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Marque SI o NO (Si marca SI en cualquier respuesta el paciente debe ser excluido del estudio)

Pacientes en los que en la intervención quirúrgica se detecten metástasis hepáticas.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Pacientes en los que finalmente no se consiga la resección del tumor por evidenciar intraoperatoriamente que el tumor es localmente avanzado irresecable.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Pacientes con episodios de pancreatitis en los tres meses previos a la cirugía.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
Pacientes con antecedentes de cáncer en los últimos cinco años.	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO

INCLUSIÓN DEL PACIENTE

El paciente ha cumplido todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión.

Los pacientes/tutores legales del sujeto de la investigación fueron informados oralmente y por escrito sobre los objetivos, métodos y riesgos potenciales de la investigación clínica y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio.

El paciente ha recibido la Hoja de Información en fecha: ____ / ____ / ____

El paciente ha firmado el Consentimiento Informado por escrito el: ____ / ____ / ____

TÉCNICA QUIRÚRGICA

1. Técnica No-Touch (NT) Completa
Clásica
2. Arteria Mesentérica Superior(AMS)

A. DATOS GENERALES

Código Hospital: _____

Código Paciente: _____

Edad: _____

Sexo: _____

B. ANTECEDENTES PERSONALES

Antecedentes médicos o quirúrgicos: _____

DM: SI NO

C. DRENAJE BILIAR PREOPERATORIO SI NO

Vía drenaje: CREP Drenaje Percutáneo

Intervalo con la cirugía (días): _____

D. DATOS QUIRÚRGICOS

Valoración anestésica del paciente: ASA I ASA II ASA III

Fecha de la cirugía: ____ / ____ / ____

Duración de la intervención (minutos): _____

Pérdidas hemáticas (mL): _____

Transfusión intraoperatoria: SI NO

Concentrados: _____

Preservación Pilórica: SI NO

Gastroenterostomía: Antecólica Retrocólica

Resección vascular: N° _____ Arterial Venosa

E. CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR

Tipo de pieza: <input type="checkbox"/> Duodenopancreatectomía cefálica <input type="checkbox"/> Duodenopancreatectomía cefálica con preservación pilórica <input type="checkbox"/> Pancreatectomía total <input type="checkbox"/> Pancreatectomía distal <input type="checkbox"/> Pancreatectomía central <input type="checkbox"/> Otros _____		Localización: <input type="checkbox"/> Cabeza <input type="checkbox"/> Cuerpo <input type="checkbox"/> Cola <input type="checkbox"/> Proceso uncinado <input type="checkbox"/> Ampolla <input type="checkbox"/> Otros _____	
Tamaño tumor: x x cm		Grado de extensión: <input type="checkbox"/> No invasión (in situ) p Tis <input type="checkbox"/> Confinado al páncreas ≤2cm de tamaño pT1 <input type="checkbox"/> Confinado al páncreas ≥2cm de tamaño pT2 <input type="checkbox"/> Invasión de estructuras adyacentes pT3 <input type="checkbox"/> Invasión estómago, bazo, colon o grandes vasos pT4	
Características macroscópicas <input type="checkbox"/> Sólido <input type="checkbox"/> Quístico <input type="checkbox"/> Polipoide <input type="checkbox"/> Otros _____		Lesiones preneoplásicas: <input type="checkbox"/> PanIN <input type="checkbox"/> IPMN <input type="checkbox"/> Otros _____	
Tipo Histológico: <input type="checkbox"/> Adenocarcinoma ductal <input type="checkbox"/> Carcinoma adenoescamoso <input type="checkbox"/> Otros _____		Lesiones no neoplásicas: <input type="checkbox"/> Obstrucción del ducto biliar <input type="checkbox"/> Obstrucción del ducto pancreático <input type="checkbox"/> Cálculos <input type="checkbox"/> Pancreatitis <input type="checkbox"/> Otros _____	
Grado de diferenciación <input type="checkbox"/> Bien diferenciado (G1) <input type="checkbox"/> Moderadamente diferenciado (G2) <input type="checkbox"/> Pobremente diferenciado (G3) <input type="checkbox"/> Indiferenciado (G4) <input type="checkbox"/> Otros _____		Tumor residual (sólo tratamiento previo): <input type="checkbox"/> Respuesta completa (grado 0) <input type="checkbox"/> Respuesta moderada (grado 1) <input type="checkbox"/> Respuesta mínima (grado 2) <input type="checkbox"/> Respuesta pobre (grado 3)	
Invasión <input type="checkbox"/> Vascular <input type="checkbox"/> Linfática <input type="checkbox"/> Perineural			
Margen circunferencial posterior (retroperitoneal)		<input type="checkbox"/> libre (>1mm) <input type="checkbox"/> afecto	
Margen circunferencial medial (vascular)		<input type="checkbox"/> libre (>1mm) <input type="checkbox"/> afecto	
		<input type="checkbox"/> directa (tumor en contacto) <input type="checkbox"/> tumor a ≤1mm Indicar distancia: _____ <input type="checkbox"/> por invasión vascular, linfática o perineural a ≤1mm <input type="checkbox"/> por metástasis ganglionar ≤1mm	
		<input type="checkbox"/> directa (tumor en contacto) <input type="checkbox"/> tumor a ≤1mm Indicar distancia: _____ <input type="checkbox"/> por invasión vascular, linfática o perineural a ≤1mm <input type="checkbox"/> por metástasis ganglionar ≤1mm	

Margen biliar: libre
 afecto

Margen pancreático: libre
 afecto

Tipo de resección: R0 R1

Adenopatías metastásicas / aisladas (total): Nx No N1

Adenopatías	Mtx	Aisladas	Adenopatías	Mtx	Aisladas
Peripancreáticas (área 13, 17, 18):			Tronco celiaco (área 9):		
Suprapilóricas (área 5):			Ligamento hepatoduodenal (área 12):		
Infrapilóricas (área 6):			Otras: _____		
Arteria gástrica izquierda (área 7):			TOTAL:		

Metástasis a distancia: M0 M1

Estadificación TNM: T
N
M

Estadío:

Comentarios:

Notas aclaratorias:

1. Grado de diferenciación (aplicado sólo adenocarcinomas ductales):

Bien diferenciado	>95% del tumor está compuesto por glándulas
Moderadamente diferenciado	50 - 95% del tumor está compuesto por glándulas
Pobrementemente diferenciado	5% - 49% del tumor está compuesto por glándulas
Indiferenciado	< 5% del tumor está compuesto por glándulas

El carcinoma de células en anillo de sello se considera grado 3 (pobrementemente diferenciado)

El carcinoma indiferenciado anaplásico se considera grado 4

F. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA

Complicaciones SI NO

Clasificación de Dindo-Cavien¹: Grado I

Grado II

Grado III a

Grado III b

Grado IV a

Grado IV b

Grado V

Sufijo "d"

¹ Clasificación según Dindo y Clavien:

Grado	Definición
I	Cualquier desviación del curso postoperatorio normal sin la necesidad de tratamiento farmacológico, quirúrgico, endoscópico o intervenciones radiológicas. Sí se permite tratamientos como antieméticos, antipiréticos, analgésicos, diuréticos, electrolitos y fisioterapia. Este grado también incluye infecciones de herida.
II	Necesidad de tratamiento farmacológico con fármacos distintos de los permitidos para complicaciones de grado I. También se incluyen transfusión de sangre y nutrición parenteral total*.
III	Necesidad de intervención quirúrgica, endoscópica o radiológica.
IIIa IIIb	Intervención sin anestesia general Intervención bajo anestesia general
IV	Complicaciones que implican un riesgo vital para el paciente (incluyen complicaciones del Sistema Nervioso Central**) y requieren manejo en una Unidad de Cuidados Intermedios o Intensivos.
IVa IVb	Disfunción de un órgano (incluida diálisis) Disfunción multiorgánica
V	Muerte
Sufijo "d"	Si el paciente sufre una complicación en el momento del alta, se añade el sufijo "d" (por discapacidad) al grado de la complicación (se incluye la resección del remanente pancreático). Este sufijo indica la necesidad de un seguimiento para evaluar de forma completa la complicación.

* Respecto al RVG: La colocación de una vía central para NPT o sonda nasoyeyunal por endoscopia en una complicación grado IIIa. Sin embargo, si la vía central o la sonda nasoyeyunal se han colocado durante la cirugía, entonces la NPT o nutrición enteral es una complicación grado II.

**Hemorragia cerebral, accidente cerebrovascular isquémico, hemorragia subaracnoidea, excluyendo ataques isquémicos transitorios.

Hemorragia: SI NO

Tipo ISGPS²: Grado A Grado B Grado C

² Clasificación de Hemorragia:

Grado	Momento de aparición, localización, gravedad e impacto clínico del sangrado	Situación clínica	Secuencia diagnóstica	Secuencia terapéutica endoscópica
A	Temprana, intra o extraluminal, leve	Bien	Observación, hematología, ECO y si es necesario TC	No
B	Temprana, intra tardía, intra o extraluminal, o extraluminal grave leve	Con frecuencia bien / intermedia muy raramente compromete la vida	Observación, hematología, ECO, arteriografía, TC, endoscopia	Transfusión de sangre, UCI, embolización terapéutica, relaparotomía por hemorragia temprana
C	Tardía, intra o extraluminal, grave	Compromete la vida	Arteriografía, TC, endoscopia	Localización de sangrado, arteriografía y embolización, (endoscopia) o relaparotomía, UCI

Fístula pancreática: SI NO

Tipo ISGPF³: No fístula Fístula grado A Fístula grado B Fístula grado C

³ Definición de Fístula Pancreática:

Criterios	No fístula	Fístula grado A	Fístula grado B	Fístula grado C
Amilasa en drenaje (a partir del 3º día postoperatorio)	<3 veces la amilasa sérica normal	>3 veces la amilasa sérica normal	>3 veces la amilasa sérica normal	>3 veces la amilasa sérica normal
Situación clínica	Bien	Bien	Con frecuencia bien	Mal/grave
Tto específico	No	No	Sí	Sí
ECO/TC (si obtenido)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Drenaje persistente (>3 semanas)	No	No	Normalmente sí	Sí
Signos de infección*	No	No	Sí	Sí
Reingreso**	No	No	Sí	Sí/No
Sepsis	No	No	No	Sí
Reoperación	No	No	No	Sí
Muerte 2ª a fístula	No	No	No	Sí

* Los signos de infección incluyen fiebre mayor de 38°C, leucocitosis, y eritema localizado, induración o drenaje purulento.

**Cualquier reingreso en el hospital dentro de los 30 días después del alta desde la intervención quirúrgica inicial.

Retraso del vaciamiento gástrico: SI NO

Tipo ISGPS⁴: Grado A Grado B Grado C

⁴ Definición de retraso del vaciamiento gástrico:

Grado de RVG	Requerimiento de SNG	Incapacidad de tolerar ingesta oral a sólidos (DPO)	Vómitos/distensión gástrica	Empleo de procinéticos
A	4-7 días o reinserción >3 DPO	7	±	±
B	8-14 días o reinserción >7 DPO	14	+	+
C	>14 días o reinserción >14 DPO	21	+	+

RVG: Retraso del vaciamiento gástrico; SNG: sonda nasogástrica; DPO: día postoperatorio.

Para excluir causas mecánicas de vaciado gástrico anormal, debe confirmarse la integridad de la gastroyeyunostomía o de la duodenoyeyunostomía por endoscopia o por serie gastrointestinal superior con gastrografin.

Parámetros para la gradación del RVG:

RVG	Grado A	Grado B	Grado C
Situación clínica	Bien	Con frecuencia bien/leves molestias	Mal/molestias graves (riesgo global aumentado debido a complicaciones y procedimientos)
Comorbilidades	No	Posiblemente sí (fuga o fístula pancreática, absceso intraabdominal)	Posiblemente sí (fuga o fístula pancreática, absceso intraabdominal)
Tto específico	Posiblemente sí (fármacos procinéticos)	Sí (fármacos procinéticos, potencial reinserción de SNG)	Sí (fármacos procinéticos, SNG)
Soporte nutricional (enteral o parenteral)	Posiblemente sí (lenta reinstauración de ingesta de sólidos)	Sí (nutrición parenteral parcial)	Sí (nutrición parenteral total Enteral a través de SNG, prolongada, ej. >3semanas)
Evaluación diagnóstica	No	Posiblemente sí (endoscopia, estudio GI superior con contraste, TC)	Sí (endoscopia, estudio GI superior con contraste, TC)
Tto intervencionista	No	No	Posiblemente sí (ej. Drenaje de absceso, relaparotomía por complicación, relaparotomía por RVG)
Prolongación de estancia hospital	Posiblemente sí	Sí	Sí
Retraso de la Potencial terapia adyuvante	No	No	Sí

TC: tomografía computarizada; RVG: retraso del vaciamiento gástrico; GI: gastrointestinal; SNG: sonda nasogástrica.

Fístula gastro o duodeno-yeyunal: SI NO
Fístula biliar: SI NO
Fístula quilosa: SI NO
Colección/Absceso abdominal: SI NO
Diarrea SI NO

Tratamiento de la diarrea y duración del tratamiento:

Transfusión postoperatoria: SI NO

Concentrados: _____

Reintervención: SI NO

Intervalo cirugía (días): _____

Causa: _____

Días de ingreso: _____

Reingreso: SI NO

Causa: _____

G. MORTALIDAD (en los primeros 30 días o durante el ingreso) SI NO

Días postoperatorio: _____

Causa: _____

H. OBSERVACIONES SOBRE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA

I. DETERMINACIÓN DE MUESTRAS INTRAOPERATORAS

1. Basal (Inicio de cirugía): _____ nº CTC/ml de sangre

2. Post-desconexión pancreática de vena porta: _____ nº CTC/ml de sangre

3. Post-resección pancreática: _____ nº CTC/ml de sangre

4. Final (previa al cierre): _____ nº CTC/ml de sangre

J. SEGUIMIENTO

SEGUIMIENTO A LOS 3 MESES

Fecha de la visita: ____ / ____ / ____

Estado: Vivo Muerto

Causa de la muerte: _____

Recidiva: SI NO

Local: _____

Sistémica: _____

DM de novo: SI NO

Tratamientos Postoperatorios: SI NO

RDT

Tipos	Dosis	Localización

QT

Esquema y Ciclos

KREON SI NO

CA 19-9 (U/ml): _____

SEGUIMIENTO A LOS 6 MESES

Fecha de la visita: ____ / ____ / ____

Estado: Vivo Muerto

Causa de la muerte: _____

Recidiva: SI NO

Local: _____

Sistémica: _____

DM de novo: SI NO

Tratamientos Postoperatorios: SI NO

RDT

Tipos	Dosis	Localización

QT

Esquema y Ciclos

KREON SI NO

CA 19-9 (U/ml): _____

SEGUIMIENTO A LOS 9 MESES

Fecha de la visita: ____ / ____ / ____

Estado: Vivo Muerto

Causa de la muerte: _____

Recidiva: SI NO

Local: _____

Sistémica: _____

DM de novo: SI NO

Tratamientos Postoperatorios: SI NO

RDT

Tipos	Dosis	Localización

QT

Esquema y Ciclos

KREON SI NO

CA 19-9 (U/ml): _____

SEGUIMIENTO A LOS 12 MESES

Fecha de la visita: ____ / ____ / ____

Estado: Vivo Muerto

Causa de la muerte: _____

Recidiva: SI NO

Local: _____

Sistémica: _____

DM de novo: SI NO

Tratamientos Postoperatorios: SI NO

RDT

Tipos	Dosis	Localización

QT

Esquema y Ciclos

KREON SI NO

CA 19-9 (U/ml): _____

SEGUIMIENTO A LOS 18 MESES

Fecha de la visita: ____ / ____ / ____

Estado: Vivo Muerto

Causa de la muerte: _____

Recidiva: SI NO

Local: _____

Sistémica: _____

DM de novo: SI NO

Tratamientos Postoperatorios: SI NO

RDT

Tipos	Dosis	Localización

QT

Esquema y Ciclos

KREON SI NO

CA 19-9 (U/ml): _____

SEGUIMIENTO A LOS 24 MESES

Fecha de la visita: ____ / ____ / ____

Estado: Vivo Muerto

Causa de la muerte: _____

Recidiva: SI NO

Local: _____

Sistémica: _____

DM de novo: SI NO

Tratamientos Postoperatorios: SI NO

RDT

Tipos	Dosis	Localización

QT

Esquema y Ciclos

KREON SI NO

CA 19-9 (U/ml): _____

K. FIN DE ESTUDIO

Curso del estudio: Finalizado Interrupción prematura

Fecha último día en el estudio: ____ / ____ / ____

Si ha habido interrupción prematura, especificar motivo principal:

- Fallecimiento
- Retirada del consentimiento del paciente
- Perdida de seguimiento
- Condiciones clínicas del paciente que impidan su continuidad
- Otras: _____

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

THE USE OF THE HOUGH'S TRANSFORM ALGORITHM TO COUNT CIRCULATING TUMOUR CELLS (CTCS)

IDENTIFICADOR: 2112140033157

Safe Creative certifica que, a 14-dic-2021 a las 14:23 UTC, consta la siguiente información en el registro electrónico de propiedad intelectual

Prueba de la obra:

Realizada el 14-dic-2021 14:07 UTC a instancia de: Oficina de Transferencia de Tecnología del SSPA ("el poseedor")

Que demuestra la posesión del archivo digital aportado por el poseedor en la fecha indicada, a los efectos protección y defensa de derechos de propiedad intelectual sobre el principio "Prior tempore, potior iure".

Inscripciones declarativas de derechos:

Titular: Oficina de Transferencia de Tecnología del SSPA	Derechos de: Proveedor de información	Fecha-hora: 14-dic-2021 14:07
Titular: SERVICIO ANDALUZ DE SALUD	Derechos de: Derechos de Explotación	Fecha-hora: 14-dic-2021 14:12
% 87.50		
Titular: UNIVERSIDAD DE SEVILLA	Derechos de: Derechos de Explotación	Fecha-hora: 14-dic-2021 14:12
% 12.50		
Titular: FRANCISCO JOSE CALERO CASTRO	Derechos de: Autor	Fecha-hora: 14-dic-2021 14:19
% 25.00		
Titular: SHEILA PEREIRA ARENAS	Derechos de: Autor	Fecha-hora: 14-dic-2021 14:20
% 25.00		
Titular: VALERIA CECILIA DENNINGHOFF	Derechos de: Autor	Fecha-hora: 14-dic-2021 14:20
% 25.00		
Titular: JAVIER PADILLO RUIZ	Derechos de: Autor	Fecha-hora: 14-dic-2021 14:23
% 25.00		



CERTIFICADO DE INSCRIPCIONES DECLARATIVAS DE DERECHOS

A la fecha y hora de emision de esta nota informativa la reserva de derechos que figura en la inscripción de esta obra es: "Todos los derechos reservados".














Código de verificación: 2112140033157-9CCUD8
<https://www.safecreative.org/certificate>
Página: 2 / 2



Article

Circulating Tumor Cells Enumeration from the Portal Vein for Risk Stratification in Early Pancreatic Cancer Patients

Javier Padillo-Ruiz ^{1,*}, Gonzalo Suarez ¹, Sheila Pereira ¹, Francisco José Calero-Castro ¹, Jose Tinoco ¹, Luis Marin ¹, Carmen Bernal ¹, Carmen Cepeda-Franco ¹, Jose Maria Alamo ¹, Francisco Almoguera ¹, Hada C. Macher ², Paula Villanueva ¹, Francisco José García-Fernandez ³, Inmaculada Gallego ⁴, Manuel Romero ³, Miguel Angel Gomez-Bravo ¹, Valeria Denninghoff ^{5,*} and María José Serrano ^{6,7,8}

- ¹ Instituto de Biomedicina de Sevilla, University Hospital Virgen del Rocío, 41013 Seville, Spain; gsartacho@gmail.com (G.S.); spereira-ibis@us.es (S.P.); fcalerocastro@gmail.com (F.J.C.-C.); jose.tinoco.gonzalez@gmail.com (J.T.); marinlm@hotmail.com (L.M.); cbernalb@hotmail.com (C.B.); carmencepedafranco@gmail.com (C.C.-F.); jmalamom@hotmail.com (J.M.A.); Fcoal94@gmail.com (F.A.); paulav91995@gmail.com (P.V.); miagb@msn.com (M.A.G.-B.)
- ² Department of Molecular Biochemistry, University Hospital Virgen del Rocío, 41013 Seville, Spain; hadacmacher@icloud.com
- ³ Department of Gastroenterology, University Hospital Virgen del Rocío, 41013 Seville, Spain; ffgarciaf.hvrocio@gmail.com (F.J.G.-F.); mromerogomez@us.es (M.R.)
- ⁴ Department of Oncology, University Hospital Virgen del Rocío, 41013 Seville, Spain; inmagallego84@hotmail.com
- ⁵ Molecular-Clinical Lab, University of Buenos Aires (UBA)—National Council for Scientific and Technical Research (CONICET), Buenos Aires C1122AAH, Argentina
- ⁶ Oncology Unit, Centre for Genomics and Oncological Research-GENYO, Pfizer, University of Granada, Andalusian Regional Government, 18016 Granada, Spain; mjose.serrano@genyo.es
- ⁷ Integral Oncology Division, Instituto Biosantario Granada (IBS-Granada), Virgen de las Nieves University Hospital, 18012 Granada, Spain
- ⁸ Department of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine, University of Granada, 18071 Granada, Spain
- * Correspondence: javierpadilloruiz@gmail.com (J.P.-R.); vdenninghoff@conicet.gov.ar (V.D.)



Citation: Padillo-Ruiz, J.; Suarez, G.; Pereira, S.; Calero-Castro, F.J.; Tinoco, J.; Marin, L.; Bernal, C.; Cepeda-Franco, C.; Alamo, J.M.; Almoguera, F.; et al. Circulating Tumor Cells Enumeration from the Portal Vein for Risk Stratification in Early Pancreatic Cancer Patients. *Cancers* **2021**, *13*, 6153. <https://doi.org/10.3390/cancers13246153>

Academic Editor: James Hicks

Received: 5 October 2021

Accepted: 3 December 2021

Published: 7 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Effective biomarkers are needed to enable personalized medicine for pancreatic cancer patients. This study analyzes the prognostic value, in early pancreatic cancer, of circulating tumor cells and clusters from the central venous catheter and portal blood. Circulating tumor cells were isolated using an immunomagnetic selection and were detected by microscopy using immunocytochemistry staining. In conclusion, the circulating tumor cell number in portal blood identifies a death risk in patients with early pancreatic cancer.

Abstract: Background. Effective biomarkers are needed to enable personalized medicine for pancreatic cancer patients. This study analyzes the prognostic value, in early pancreatic cancer, of single circulating tumor cell (CTC) and CTC clusters from the central venous catheter (CVC) and portal blood (PV). Methods. In total, 7 mL of PV and CVC blood from 35 patients with early pancreatic cancer were analyzed. CTC were isolated using a positive immunomagnetic selection. The detection and identification of CTC were performed by immunocytochemistry (ICC) and were analyzed by Epi-fluorescence and confocal microscopy. Results. CTC and the clusters were detected both in PV and CVC. In both samples, the CTC number per cluster was higher in patients with grade three or poorly differentiated tumors (G3) than in patients with well (G1) or moderately (G2) differentiated. Patients with fewer than 185 CTC in PV exhibited a longer OS than patients with more than 185 CTC (24.5 vs. 10.0 months; $p = 0.018$). Similarly, patients with fewer than 15 clusters in PV showed a longer OS than patients with more than 15 clusters (19 vs. 10 months; $p = 0.004$). These significant correlations were not observed in CVC analyses. Conclusions. CTC presence in PV could be an important prognostic factor to predict poor prognosis in early pancreatic cancer. In addition, the number of clustered-CTC correlate to a tumor negative differentiation degree and, therefore, could be used as a diagnostic biomarker for pancreatic cancer.

Keywords: circulating tumor cell; cluster; portal vein; central venous catheter; pancreatic cancer; early stage; death risk stratification

Highlights

- CTCs can be detected in the early stages of pancreatic cancer.
- CTC inside a cluster is much higher in G3 than in G1–2 in both samples.
- The larger the size of the tumor, the greater the number of total CTC for PV and CVC samples.
- The number of CTC < 185 in PV (HR = 4.464; $p = 0.016$) and no vascular invasion (HR: 3.663; $p = 0.013$) were independent predictors of better long-term survival.

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most aggressive cancers associated with poor prognosis and high mortality. It has a natural tendency toward very early spread, even in resectable cases. Low-grade pancreatic cancers (G1) tend to grow and spread more slowly than high-grade (G3) cancers. Most of the time, G3 tends to have a poor prognosis compared to G1 or G2 cancers [1–3]. Therefore, it is necessary to find prognostic markers that identify the minimal residual disease and predict the risk of relapse. Seriate analyses of CA19-9 during chemotherapy represent practical and specific markers of response to the treatment itself. Other relevant prognostic parameters are the presence of perineural, vascular, and lymphatic invasion, which are essential characteristics for tumor growth and dissemination [1–3].

Unfortunately, there are currently no prognostic and predictive markers to indicate the presence of vascular, neural, or lymphatic invasion, hindering the clinical management of patients and, therefore, their possibility of cure. Among several biomarkers that could be evaluated preoperatively, single circulating tumor cells (CTC), as part of the liquid biopsy family, could be one of the proposed clinical markers. Several studies have reported CTC's prognostic and predictive value in cancer patients, including pancreatic cancer [4–6]. In solid tumors, detection of CTC is usually performed using peripheral blood. Still, this search has not been possible in pancreatic cancer because blood flow first drains into the portal vein (PV), continues to the liver, and finally reaches the peripheral blood. Consistently, previous work has shown that CTC in patients with pancreatic cancer is detected with greater certainty in PV than in the peripheral venous blood of such patients [7]. Little is known about the characteristics and clinical implications of finding CTC clusters in PV. Although there are studies in advanced pancreatic cancer [8,9], only a few evaluate the role of CTC and clusters in the portal and central venous blood in patients with early pancreatic cancer as preoperative markers of risk stratification [7,10]. In this work, CTC and clusters were evaluated in patients with early pancreatic adenocarcinoma from the portal and central venous blood samples collected simultaneously during pancreaticoduodenectomy (PD). This study aimed to correlate CTC and clusters count from PV and central venous catheter (CVC) with tumor grade, preoperatively tumor size/CA19-9, and vascular/lymphatic/neural invasion. Additionally, to correlate this finding with overall survival (OS) and disease-free interval (DFS), including liver metastasis or local recurrence.

2. Material and Methods

2.1. Study Design and Sample Collection

This work was a prospective cross-sectional and longitudinal study involving 35 patients with carcinoma in the head of the pancreas. Patients with metastasis were excluded, and all patients received gemcitabine as treatment. Twenty-two were men and 13 women with a mean age of 67.4 ± 9.8 years old. The Ethics Committee of the University Hospital Virgen del Rocio approved the study protocol. Informed consent was obtained from all patients. According to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Classification of Malignant Tumors, the study included stages I ($n = 15$) and II ($n = 20$)

of disease. Only patients in whom no metastasis was shown by ¹⁸F-Fluoro-deoxyglucose positron emission tomography and computed tomography (FDG-PET-CT) underwent surgery. Biopsy was also performed for any suspicious lesions, and if an intraoperative analysis was positive for metastatic adenocarcinoma, PD was canceled. The exclusion criteria were metastatic cancer diagnosis, locally advanced tumor, pancreatitis episodes within the three months before surgery, and previous history of cancer within the past five years. The tumor size and CA 19-9 (268.3 ± 586.9 U/mL) were preoperatively evaluated. PD was performed in all 35 patients. Complete resection (R0) was achieved in 24 (69%) patients according to established protocol [11,12]. Based on their differentiation, tumors were divided into three grades: well-differentiated (G1) in 8 (23%) patients, moderately differentiated (G2) in 20 (57%), and poorly differentiated (G3) in 7 (20.0%). The microscopic vascular invasion was observed in 13 (37%) patients, lymphatic invasion in 9 (26%), and neural invasion in 18 (51%). Adjuvant chemotherapy based on gemcitabine-based formula was administered postoperatively after pathological diagnosis of pancreatic carcinoma for 35 patients. All cases were followed prospectively during 24 months. A CT scan was performed to diagnose liver metastases and local recurrence as a low-density mass in the liver or surgical area.

2.2. Validation of CTC Detection

Cell culture Pancreatic cancer cell PANC-1 (ATCC[®] CRL-1469, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza BE12-604F, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum (F7524, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1% Penicillin/Streptomycin (15140122, GIBCO). Cell cultures were grown in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. Once the cells were needed, the cells were washed with Trypsin-EDTA (25300062, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Pancreatic cancer cells (PCC) were used as a positive control. Two control groups were used for negative and positive control. For technical negative control, 7 mL aliquots of peripheral blood were collected from healthy donors ($n = 3$) and were mixed with approximately 300 PCC for positive control. All samples were isolated with the Isoflux[™] system and detected following the manufacturer's protocol by Fluxion. The specificity of the anti-cytokeratin (CK) was evaluated using the pancreatic tumor PANC-1 cell line (ATCC[®] CRL-1469, Manassas, VA, USA) as a positive control because it has a high CK protein expression; and the peripheral blood mononuclear cell (PMBC) as a negative control for its non-expression of EpCAM and CK (source: The human protein atlas).

Clinical negative controls of PV samples would not be ethically approved because there are surgical risks in that sampling. Regardless of this group, we included CVC samples from a non-neoplastic control group based on their clinical history, such as those undergoing cardiac surgeries. Therefore, the sample from 8 patients was extracted from the pre-implanted CVC before cardiac surgery. We performed oncological biochemical markers of these patients in the sample extracted simultaneously: prostate-specific antigen (PSA), alpha-fetoprotein (AFP), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen-15.3 (CA15-3), carbohydrate antigen-19.9 (CA-19.9), carbohydrate antigen-125 (CA-125). As an inclusion criterion to consider as proper negative controls for the recruited patients, we determined that the oncological markers tested in the sample extracted simultaneously and in the same place as the one extracted for CTC evaluation had average values.

2.3. CTC Isolation, Detection, and Enumeration

During surgery, before manipulating the tumor, 7 mL blood samples were simultaneously obtained from the CVC tip in the superior vena cava and from the PV by direct puncture. The first blood-draw was discarded to exclude epithelial cells dislodged by the venipuncture (these factors play a role in the frequency of epithelial cells in the blood, as these steps may lead to unspecific shedding of epithelial cells). Both patient samples were collected in K2-EDTA Vacutainer tubes, maintained at room temperature, and processed 24 h after collection. Blood samples were enriched in peripheral mononuclear blood cells

using gradient centrifugation with Histopaque®-1119, and CTC were isolated using the IsoFlux platform. Isoflux platform has been designed to isolate the CTC based on a microfluidic process for immunomagnetic positive selection. The IsoFlux™ system utilizes micrometer-scale beads, which have been shown to result in a magnetic moment that is sufficient for capturing cells even with low target expression [13]. The process is automatic, increasing the ability to capture the CTC. The Isoflux™ Epithelial to Mesenchymal Transitions Circulating Tumor Cell Enrichment Kit (EMT Enrichment Kit, Izasa, Catalog N.910-0106, Werfen, San Diego, CA, USA) was used for performing CTC enrichment. In this kit, beads were conjugated with four different antibodies, targeting both epithelial and mesenchymal markers. The kit utilizes both anti-EpCAM and anti-EGFR-antibodies for the detection of epithelial cells, as well as anti-N-Cadherin and anti-Vimentin as mesenchymal markers. The EpCAM is a cell surface molecule known to be highly expressed in solid cancers. The immunomagnetic beads conjugated with antibodies were added to cells suspended in IsoFlux Binding Buffer and incubated for 90 min at 4 °C, as indicated in the Fluxion protocol. Subsequently, they were subjected to immunomagnetic isolation with IsoFlux (Fluxion Biosciences Inc). After the sample was processed, the enriched cells were fixed and stained with the fluorescent reagents (Isoflux™ Circulating Tumor Cell Enumeration Kit Izasa Catalog N.910-0093, Werfen, San Diego, CA, USA). The fluorescent reagents included were anti-CK-fluorescein isothiocyanate (FITC) specific for the intracellular protein CK, characteristic of epithelial cells; anti-CD45-Indocarbocyanine (Cy3) specific for leukocytes; and Hoechst 33342, a nucleic acid stain cell-permeant nuclear counterstain that emits blue fluorescence when bound to AT-rich regions of the minor groove in DNA. The CTC detection and enumeration were performed by fluorescence microscopy, and the images obtained were processed using image software based on the Hough transform (VR-CTC). We had described previously a method based on image processing to count sets of pixels showing a cell nucleus, cytokeratin expression, and no CD45 expression [14]. To count them, the Hough transform was used. The approach allowed a classification of the events counted in CTC, cluster, and clustered-CTC. Then, CTC were enumerated as morphologically intact CK+/CD45-/nucleated cells. The size of cells and clusters and the number of clustered CTC were also characterized. The mean coefficient of variation in CTC determination was less than 2% [0–1.41]. The sensitivity presented by this approach was 85.58%, and the specificity was 88.16% [14]. The results obtained were compared with counting undertaken by a technician. High correlations were demonstrated in total pancreatic tumor cells in healthy donors ($R^2 = 0.995$) and patients with pancreatic cancer ($R^2 = 0.955$) as well as in free cells ($R^2 = 0.993$ and $R^2 = 0.975$, respectively) [14].

2.4. Statistical Analysis

Single regression analysis was performed to assess the linearity of the two blood samples for detecting CTC. The correlation of CTC counts and tumor invasion (vascular, lymphatic, and neural) was analyzed using the Mann–Whitney U test and the Kruskal–Wallis H test. The distributions of patients above and below the cut-off level in CTC were compared using Fisher’s exact test. Spearman’s rank correlation coefficient examined the relationship between CTC counts and the tumor marker (Ca19.9). Survival analysis was done using the product-limit Kaplan–Meier and the log-rank test. Multivariate analysis was performed using a Cox proportional hazard model to test for independent prognostic variables. All statistical calculations were carried out using IBM Corp. released 2020, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY, IBM Corp. The required significance was $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Validation of CTC Detection

These experimental analyses included tumor cell lines and healthy donors as positive and negative technical controls, respectively. Negative control presented 0.67 ± 0.31 CTC/mL in blood from healthy donors whereas positive control showed 37.15 ± 9.09 PCC/mL (PCC

total = 185.75 ± 45.43). Positive controls showed that the detection rate of CTCs with this methodology is approximately 55%.

The non-neoplastic control group included eight CVC samples from patients who underwent cardiac surgeries, had no history of cancer in their medical history, and had average results in their tumor biochemical markers taken from the sample simultaneously. These negative controls showed 0.87 ± 0.39 CTC/mL in CVC blood, which found no clusters. The median obtained was 0.50 CTC/mL with a range between 0.00 and 1.75. There are differences in CVC between the number of CTC/mL of patients with pancreatic cancer and non-neoplastic patients who underwent cardiac surgery (U-Mann Whitney p -value < 0.001). No clusters were found in the non-neoplastic group, unlike in samples from pancreatic cancer patients with a median (range) of 14.5 (3.8–35.5) cluster/mL.

3.2. Longitudinal Enumeration and Cluster Evaluation

Single CTC and clusters were detected in all patients, both in PV and CVC (Figure 1). The analysis showing the correlation of CTC values on CVC vs. PV appeared in Table 1. In the three measures, Pearson's correlation had a coefficient $r = 0.6$ between PV and CVC. We found more CTC, clusters, and total CTC in CVC than PV, with no statistically significant differences (Table 1). The ratio and sizes are merely informative data used as quality control between trials, which should not differ between the samples 291.8 (120.0–500.0).

Table 1. CTC characterization by Hough transform method.

Research Variable	PV (Median, Range)	CVC (Median, Range)	U-Mann Whitney p -Value	Correlation	Correlation p -Value
Free CTC (cell/mL)	235.4 (101.3–375.3)	291.8 (120.0–500.0)	0.151	0.6	0.004
Cluster/mL	12.9 (4.8–33.0)	14.5 (3.8–35.5)	0.622	0.6	0.001
CTC inside a cluster	30.4 (12.5–89.4)	37.4 (11.3–89.5)	0.205	0.5	0.008
Total CTC (cell/mL)	310.0 (132.1–446.0)	405.7 (130.7–553.8)	0.239	0.6	0.001
Ratio Free CTC/CTC inside a cluster	2.6 (2.4–3.0)	2.5 (2.3–2.9)	0.051	0.2	0.306
Free CTC median size	7.5 (6.8–8.7)	7.8 (6.7–9.0)	0.981	0.3	0.229
CTC inside a cluster median size	10.2 (8.5–11.6)	10.3 (8.6–11.7)	0.990	0.3	0.074

When the data obtained were compared by discriminating according to the tumor grade, the values reached in the same tumor grade showed that in CVC, they are higher than in PV (Tables 2 and 3). When comparing tumor grades for the same sampling site, we found that for both samples, the data that most attracts attention is CTC inside a cluster, which is much higher in G3 than in G1/2, despite not having significant differences. The ratio and sizes have no variation as we expected.

Table 2. Correlation CTC and clusters according to the degree of tumor differentiation (CVC measurements).

Research Variable	G1–G2	G3	p -Value
Free CTC (cell/mL)	279.2 (120.3–482.3)	357.0 (182.5–1020.8)	0.483
Cluster/mL	14.0 (3.3–31.7)	41.0 (17.9–46.8)	0.107
CTC inside a cluster	36.7 (8.7–73.7)	97.3 (54.5–116.3)	0.071
Total CTC (cell/mL)	399.0 (129.0–538.5)	481.0 (243.0–1117.7)	0.318
Ratio Free CTC/CTC inside a cluster	2.6 (2.4–2.9)	2.4 (2.2–3.1)	0.483
Free CTC median size	7.8 (6.6–9.1)	8.6 (6.7–10.2)	0.521
CTC inside a cluster median size	10.3 (8.7–11.6)	10.6 (7.8–13.2)	0.908

Table 3. Correlation CTC and clusters according to the degree of tumor differentiation (PV measurements).

Research Variable	G1–G2	G3	p -Value
Free CTC (cell/mL)	240.3 (102.2–373.3)	227.0 (140.8–559.0)	0.841
Cluster/mL	10.5 (4.3–32.7)	7.5 (30.0–80.3)	0.310
CTC inside a cluster	29.7 (9.2–74.2)	78.5 (21.3–260.6)	0.201
Total CTC (cell/mL)	314.5 (133.0–406.7)	305.5 (162.1–819.6)	0.725
Ratio Free CTC/CTC inside a cluster	2.6 (2.3–2.9)	2.8 (2.6–3.9)	0.150
Free CTC median size	7.3 (6.5–8.5)	8.5 (7.0–9.6)	0.310
CTC inside a cluster median size	9.7 (8.1–11.5)	10.2 (9.5–12.4)	0.335

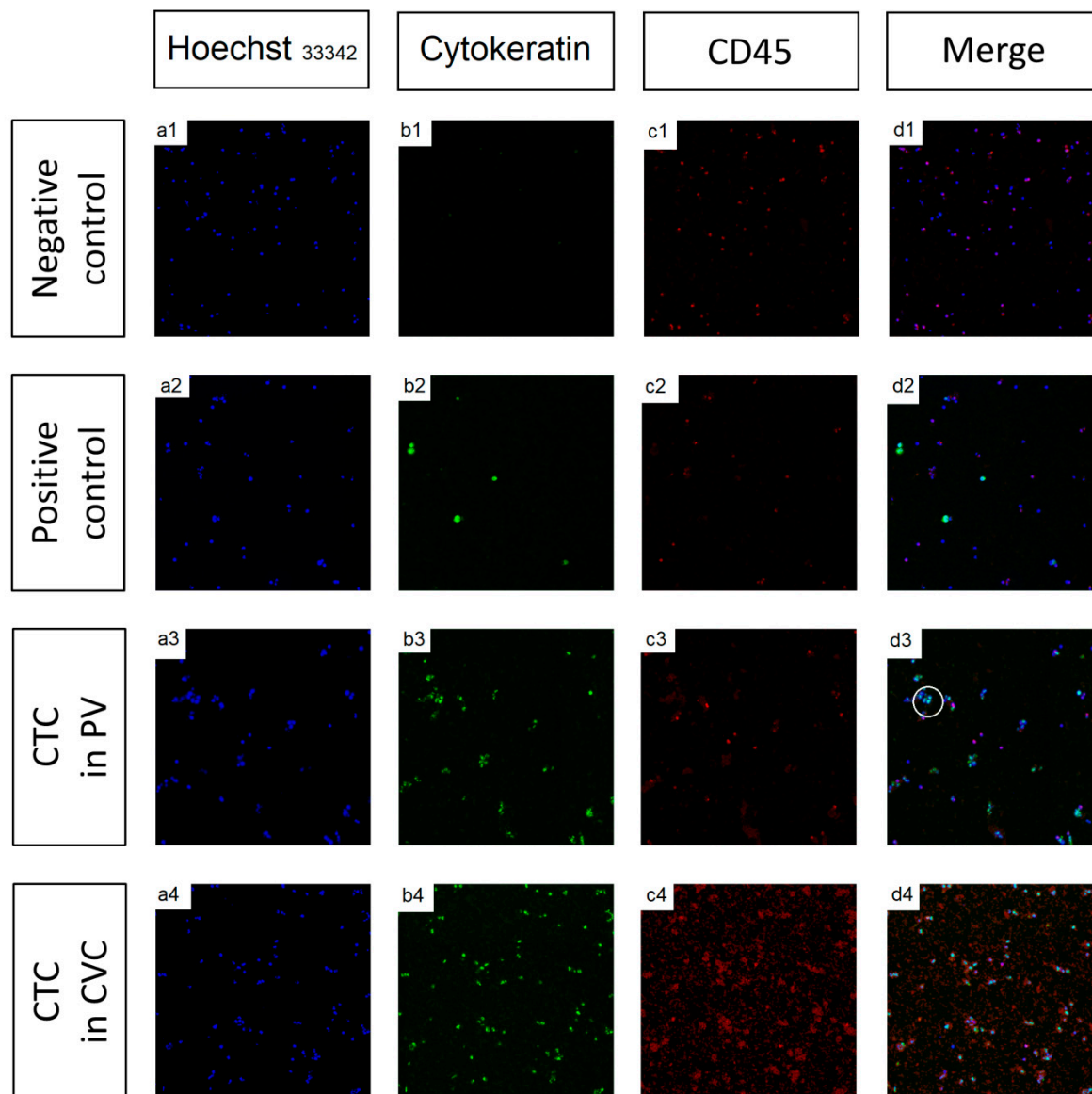


Figure 1. Epifluorescence microscopy pictures. The CTC detection and enumeration were performed by fluorescence microscopy, and the images obtained were processed using image software based on the Hough transform (VR-CTC). The CTC recovery was stained with: (a) anti-CK-fluorescein isothiocyanate (FITC) specific for the intracellular protein cytokeratin (characteristic of epithelial cells) (Green); (b) anti-CD45-Indocarbocyanine (Cy3) specific for leukocytes (Red); (c) Hoechst 33342, used for nuclear staining (Blue); and (d) merged image subject to logical operations where we performed a logical multiplication between the thresholding of channels Blue (nuclear) and Green (CK). Finally, we removed the pixels of the thresholding of channel Red (CD45). We eliminated artifacts from the resulting mask using Matlab tools. The white circle in d3 shows the merged image of CTC, which is CK⁺/CD45⁻/nucleated cells; in this way, image pixels are Hoechst⁺, CK⁺, and CD45⁻—corresponding to a CTC. Data from (1) negative control (PMBC), (2) positive control (PANC-1 cell line), (3) CTC detected in PVC, and (4) CTC detected in CVC.

The preoperative CA 19-9 levels and tumor size measured by CT scan were analyzed and correlated with CTC and CTC clusters. In both samples, CVC and PV, we did not find a significant association (Tables 4 and 5). We used the Spearman correlation coefficient (Rho) for these analyses, which takes values from +1 to −1. A Rho of +1 indicates a perfect association of ranks, a Rho of zero indicates no association between levels, and an r of −1 indicates a perfect negative association of grades. The closer Rho is to zero, the weaker

the association between the ranks. Therefore, relationships identified using correlation coefficients should be interpreted as associations and not as causal relationships [15]. In both samples, the value of CA 19-9 has a positive relationship with CTC/cluster.

Table 4. Tumor and CA 19-9 preoperatively evaluated by CTC characteristics with Spearman correlation coefficient (Rho) (CVC measurements).

Research Variable	CA 19-9 (Rho)	Tumor Size * (cm) (Rho)
Free CTC (cell/mL)	0.5	0.1
Cluster/mL	0.2	−0.1
CTC inside a cluster	0.2	−0.1
Total CTC (cell/mL)	0.4	0.4
Ratio Free CTC/CTC inside a cluster	−0.3	−0.3
Free CTC median size	−0.5	−0.1
CTC inside a cluster median size	−0.6	−0.6

* Measured by CT scan.

Table 5. Tumor and CA 19-9 preoperatively evaluated by CTC characteristics with Spearman correlation coefficient (Rho) (PV measurements).

Research Variable	CA 19-9 (Rho)	Tumor Size * (cm) (Rho)
Free CTC (cell/mL)	0.4	0.3
Cluster/mL	0.3	0.3
CTC inside a cluster	0.3	−0.1
Total CTC (cell/mL)	0.4	0.4
Ratio Free CTC/CTC inside a cluster	0	0
Free CTC median size	−0.1	−0.1
CTC inside a cluster median size	−0.2	0

* Measured by CT scan.

Other factors related to survival are neural, vascular, and lymphatic invasion (Tables 6 and 7). There was no significant correlation between CTC measurements with neural, vascular, or lymphatic invasion. Still, we are struck by the high number of CTCs (free and total) in PV samples in patients with vascular invasion concerning those who do not have it. The biological mechanism of tumor hematogenous dispersal is associated with vascular invasion.

Table 6. Correlation of CTC and CTC clusters with microscopic invasion (CVC measurements).

Research Variable	Free CTC (Cell/mL)	p-Value	Cluster/mL	p-Value	Total CTC (Cell/mL)	p-Value
Vascular invasion	304.9 (151.6–656.4)	0.662	12.1 (3.1–29.5)	0.368	421.8 (162.7–697.9)	0.692
No vascular invasion	291.8 (116.1–480.9)		26.6 (4.3–41.0)		384.4 (123.3–522.5)	
Lymphatic invasion	304.9 (79.1–455.7)	0.504	31.1 (2.7–42.6)	0.565	421.8 (87.8–501.6)	0.629
No lymphatic invasion	291.8 (133.1–582.6)		13.3 (3.8–31.0)		384.4 (161.0–627.4)	
Neural invasion	350.5 (84.9–498.5)	0.728	13.4 (2.7–42.1)	0.667	443.1 (86.8–537.7)	0.728
No neural invasion	275.8 (164.5–625.3)		14.5 (10.5–32.8)		384.4 (198.2–668.0)	

Table 7. Correlation of CTC and CTC clusters with microscopic invasion (PV measurements).

Research Variable	Free CTC (Cell/mL)	p-Value	Cluster/mL	p-Value	Total CTC (Cell/mL)	p-Value
Vascular invasion	321.7 (217.4–451.3)	0.104	16.3 (5.5–41.5)	0.362	374.2 (271.0–508.7)	0.089
No vascular invasion	184.5 (97.2–322.3)		12.3 (3.2–29.9)		247.2 (125.4–401.0)	
Lymphatic invasion	204.7 (74.0–514.3)	0.489	23.8 (5.8–52.5)	0.397	350.5 (88.9–635.6)	0.939
No lymphatic invasion	248.2 (118.2–377.3)		12.3 (4.3–31.3)		305.5 (138.2–419.2)	
Neural invasion	247.3 (94.3–375.3)	0.905	13.8 (5.5–34.5)	0.528	327.3 (120.6–492.4)	0.798
No neural invasion	222.5 (113.0–370.8)		10.3 (3.1–32.2)		285.2 (141.1–404.7)	

3.3. Prognostic Factors for Long-Term Survival

Regarding OS, the median survival time was 18 months (range 12.5–23.5 months) without postoperative mortality. Thirty of the 35 patients (86%) survived for more than six months, with 20 (57%) of them still alive one year after the primary diagnosis.

Once the media (m) and standard derivation were calculated, based on Altman optimal cut-off approximation, we estimated the p67 (or p33) value consulting in a probability table of the normal distribution the value of $Pr(z < z) = 0.67$, that corresponds to 0.724 [16]. Therefore, we estimate that quartile as $m + 0.724s$. Usually, the literature uses Q3 (p75) to consider the high value and Q1 (p25) to low values. We decided to use p33 instead of p25 to increase the sensibility at lower specificity. In our opinion, to evaluate possible cut-off points, we did not recommend using extreme values on each side. Therefore, it is excluded between 5 and 10% of each endpoint.

According to these results, to predict a G3 pancreatic adenocarcinoma presence, we established a cut-off for cluster number of 20 clusters/mL and CTC inside a cluster of 64 CTC/cluster. The prognostic value of CTC was set in the 33rd percentile (p33), resulting in a cut-off point of 185 (SD 45.3) CTC and 15 (SD 6.8) clusters [15].

Regarding PV measurements, the median patient's survival was significantly longer in patients with less than 185 CTC (24.5 months (IC 19.6–29.4) vs. 10 months (CI 95% 7.4–12.5); $p = 0.018$) and less than 15 clusters (19 months (CI 95% 15.8–22.2) vs. 10 months (CI 95% 7.2–12.8); $p = 0.004$) (Table 8 and Figure 2). These findings were not found in CVC samples. Patients with vascular ($p = 0.005$) or lymphatic invasion ($p = 0.044$) were associated with less survival. However, the neural invasion did not correlate with OS (Figure 3).

To identify prognostic factors for long-term survival, we used a stratified univariate and multivariable Cox regression. The multivariable analysis showed that both the number of CTC < 185 (HR = 4.464; $p = 0.016$) and no vascular invasion (HR: 3.663; $p = 0.013$) were independent predictors of better long-term survival (Table 9).

Table 8. Median survival by groups (months).

Research Variable	Deaths N (%)	Median Survival	95% CI	Log-Rank-Value
<185 portal CTC	5 (38.5)	24.5	19.6–29.4	0.018
≥185 portal CTC	14 (63.6)	10.0	7.4–12.5	
<15 portal clusters	8 (42.1)	19.0	15.8–22.2	0.040
≥15 portal clusters	11 (68.8)	10.0	7.2–12.8	
No vascular invasion	9 (40.1)	22.5	17.7–27.2	0.005
Vascular invasion	10 (76.9)	10.0	5.3–14.7	
No lymphatic invasion	11 (42.3)	18.0	15.6–23.8	0.044
Lymphatic invasion	8 (88.8)	10.0	5.6–14.4	
No neural invasion	7 (41.2)	21.5	15.5–27.4	0.249
Neural invasion	12 (66.7)	13.0	4.9–21.0	
Degree of differentiation				0.003
G1–G2	15 (53.5)	19.0	4.6–23.1	
G3	2 (40.0)	16.0	7.7–24.7	
Global survival		18.0	12.5–23.5	

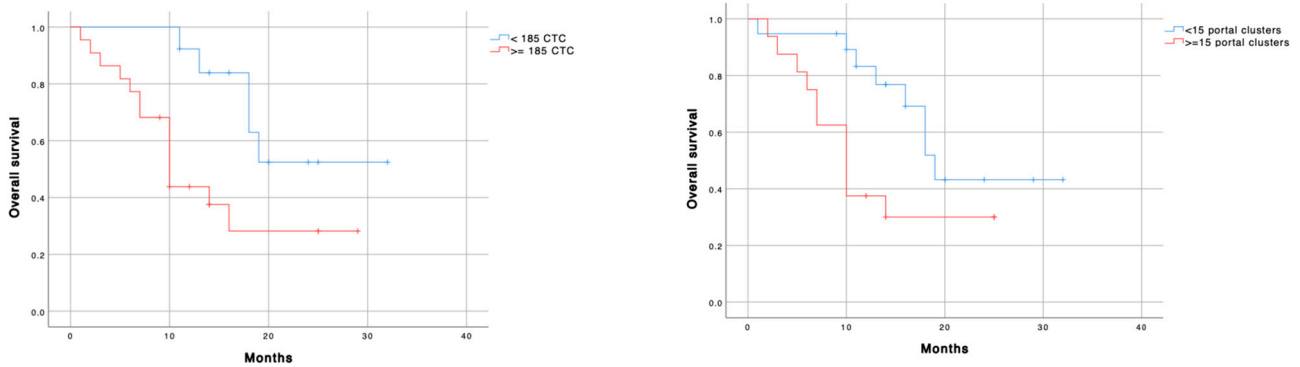


Figure 2. Overall survival according to left) PV-CTC’s cut-off; and right) PV-cluster number’s cut-off. Blue line: low cellular expression; Red line: high cellular expression. ≥ 185 CTC HR = 3.263 (1.135–5.221); $p = 0.028$. ≥ 15 clusters HR = 2.486 (0.989–6.247); $p = 0.053$.

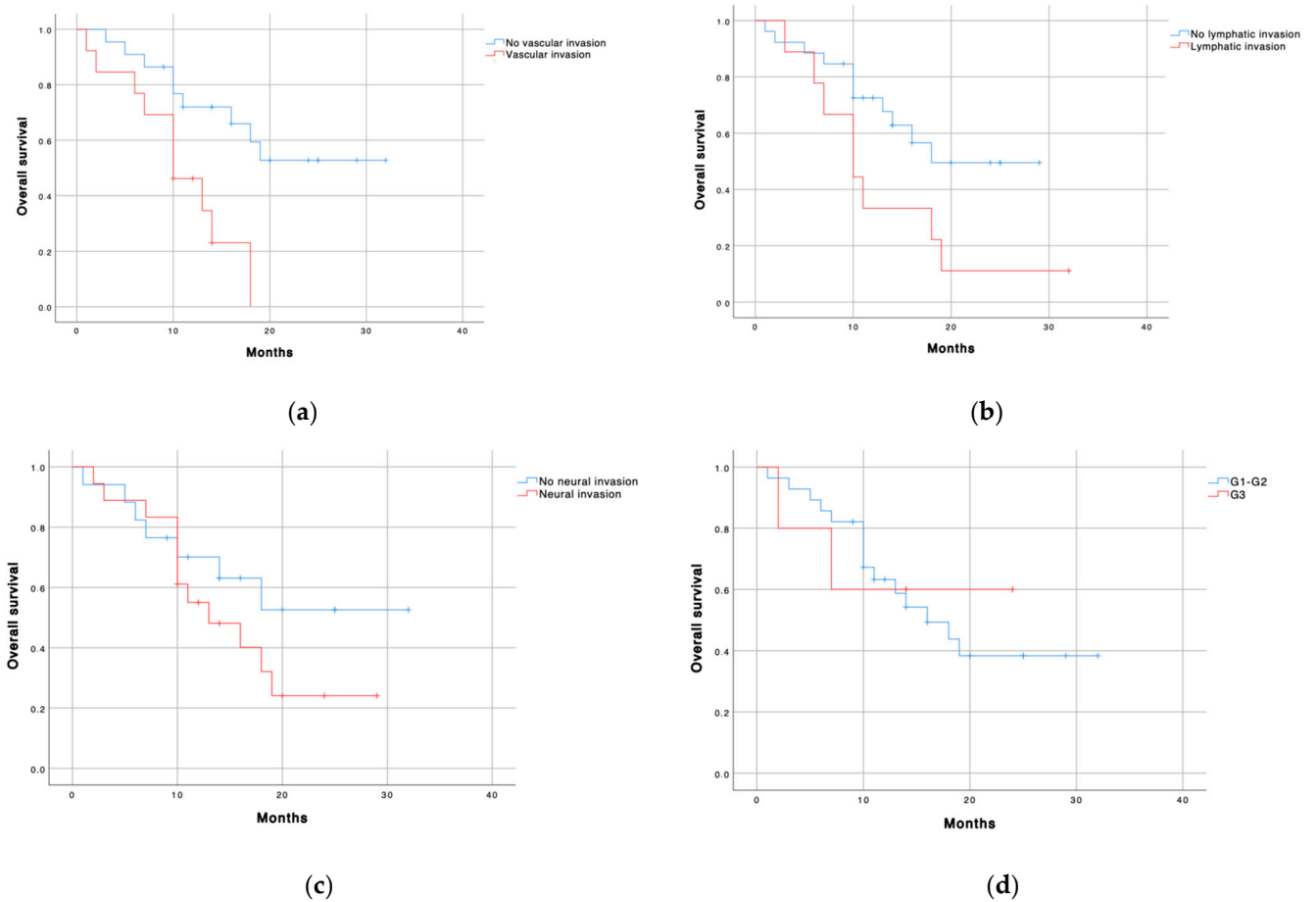


Figure 3. Overall survival according to (a) vascular invasion, HR = 3.568 (1.346–9.457); $p = 0.011$; (b) lymphatic invasion, HR = 2.418 (0.969–6.031); $p = 0.058$; (c) neural invasion, HR = 1.698 (0.666–4.328); $p = 0.268$; and (d) tumor grade differentiation, HR = 0.841 (0.196–3.771); $p = 0.841$. Blue line: no invasion or low grade (G1–2); red line: invasion or high grade (G3).

Table 9. Prognostic factors for long-term survival. Covariates were patient age, disease stage (I–II), portal CTC ≥ 185 , portal clusters ≥ 15 , microscopic invasion (vascular, lymphatic, neural), and tumor degree of differentiation (G1–3).

Research Variable	Univariate			Multiple		
	HR	95% CI	<i>p</i> -Value	HR	95% CI	<i>p</i> -Value
Sex (male)	2.050	0.789–5.325	0.140			
Age	1.000	0.949–1.054	0.988	-		
Stage I vs. II	1.566	0.555–4.415	0.396	-		
≥ 185 portal CTC	3.236	1.135–5.221	0.028	4.464	1.316–15.152	0.016
≥ 15 portal clusters	2.486	0.989–6.247	0.053	1.330	0.443–4.528	0.624
Vascular invasion	3.568	1.346–9.457	0.011	3.663	1.321–10.204	0.013
Lymphatic invasion	2.418	0.969–6.031	0.058	2.512	0.940–6.711	0.066
Neural invasion	1.698	0.666–4.328	0.268	-		
G1–2 vs. G3	0.841	0.196–3.771	0.841	-		

CI: confidence interval; HR: adjusted hazard ratio.

3.4. Prognostic Factors for Long Term Local and Systemic Progression

Excluding incomplete resections, 23/35 (96%) patients had local recurrence disease-free survival for more than six months, with 22 (92%) of them being still local progression-free one year after the primary diagnosis. However, the median disease-free interval related to local recurrence was longer in patients with <185 CTC (28.5 vs. 25.0 months; $p = 0.647$) and less than 15 clusters (29.0 vs. 22.5 months; $p = 0.787$) in PV, differences were not significant. The vascular or neural invasion also failed to achieve correlation. Only the lymphatic invasion was associated with less local recurrence disease-free survival (12.0 vs. 23.0 months; $p = 0.001$). In fact, in the multivariable Cox regression analysis, the only lymphatic invasion was an independent predictor of disease-free interval for local recurrence ($p = 0.031$).

Regarding systemic progression (liver metastases), 18 of the 35 patients (75%) had systemic progression-free survival for more than one year after the primary diagnosis.

Regarding local recurrence, although the median disease-free interval related to metastases was longer in patients with <185 CTC (20.5 vs. 18.0 months; $p = 0.636$) and less than 15 clusters (24.0 vs. 18.0 months; $p = 0.383$) measured in PV, differences were not significant (Figure 4).

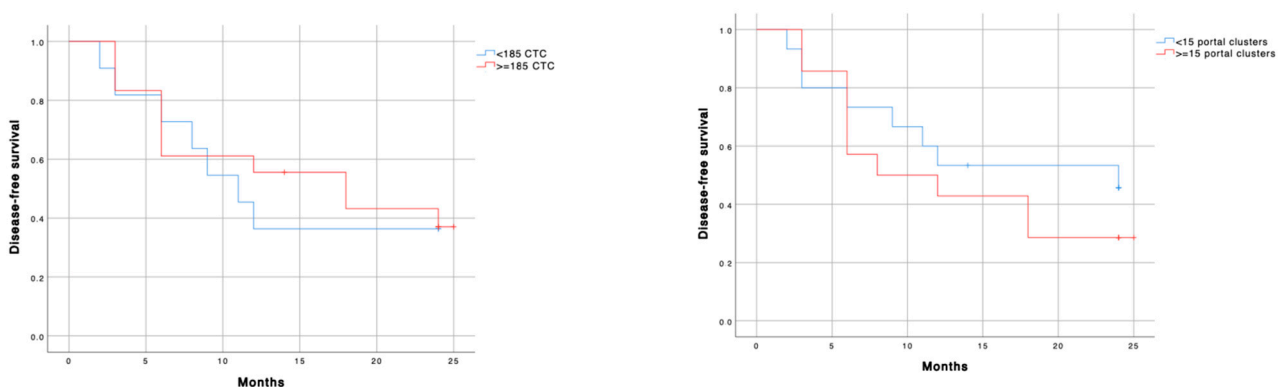


Figure 4. Disease-free survival according to left) PV-CTC 's cut-off; and right) PV-cluster number 's cut-off. Blue line: low cellular expression; red line: high cellular expression. <185 CTC (28.5 vs. 25.0 months; $p = 0.647$) and <15 clusters (29.0 vs. 22.5 months; $p = 0.787$).

4. Discussion

In the present study, we analyzed the prognostic value of both single CTC and clustered-CTC presented in the samples of patients with early-stage adenocarcinoma in the head of the pancreas. One of the critical points in the therapeutic approach in pancreatic cancer is determining early markers that evaluate the prognosis and thus facilitate

therapeutic decisions. At present, we must wait to have an appropriate biopsy to assess prognostic information. Biopsies are often difficult to obtain before deciding whether the best option for the patient is surgery or chemotherapy. Hence, the challenge is to be able to identify early markers in these patients. On the one hand, liquid biopsy and especially CTC have been postulated as potential biomarkers [17]. However, its determination in pancreatic cancer remains uncertain since different markers have been used to detect heterogeneous forms of CTC [10,18–20]. Additionally, on the other hand, clusters have been proposed as possible prognostic factors in pancreatic adenocarcinoma [17]. Nevertheless, the potential role of the number of cells within clusters or their size has not been determined. The present study determined the characteristics of both free CTC (number and size) and clusters (number, size, and CTC inside a cluster) by immunofluorescence with Hoechst 33342, epithelial marker cytokeratin, and CD45 through the Hough transform CTC measurement [14]. Samples were obtained from CVC and PV to determine the best approach to evaluate the potential correlation of CTC measurements with the patient's prognosis.

CTC could be detected in the early stages of pancreatic cancer in both blood samples in all patients. CTC was listed as morphologically intact CK+/CD45-/nucleated cells [14]. As the positive immunomagnetic selection that has been used is not 100% effective in discriminating CD45 contaminant cells, if any, antibodies directed against CD45 were used to identify and differentiate CTCs from PBMC. Different combinations of devices and software for CTC enumeration have shown sensitivity, specificity, and a high correlation in the number of CTC detected, but always under the supervision of a technician. Our previous work described that the Hough transform was an excellent approach to counting CTC, defined as an EpCAM nucleated cell, positive CK, but CD45 negative. This image analysis method could be extrapolated to count CTC isolated by CellSearch® or another device when samples are labeled EpCAM. In addition, this approach could allow us to count other cells by processing the image channels according to the expression of the spots that define the cells under study [14]. We chose the EpCAM-Isoflux™ System because, in previous works, significantly more CTC were isolated using the same isolation target, EpCAM, on the IsoFlux™ system, compared with CellSearch®. However, direct comparison of the CTC isolation by the two different platforms is complex due to using other clones of the same antibody and magnetic beads for capture. The IsoFlux™ system utilizes micrometer-scale beads, which have been shown to result in a magnetic moment that is sufficient for capturing cells even with low target expression [13]. Different detection sensibilities have been reported in the literature. Still, they are not comparable to our study because we have used a highly effective enrichment method with an automated form of enumeration, which has allowed us to detect CTCs in 100% of the samples in patients with early pancreatic cancer. The work of Hugenschmidt et al. studied CTC from blood samples before surgery, including patients with advanced stages with CellSearch® enrichment, manual image analysis, and obtained 7% detection [21]. White et al. increased detection sensitivity to 71% because they studied CTC from PV samples and included patients with advanced stages with CellSearch® enrichment and manual image analysis [22]. Buscail et al. detected 45–59% with two different CTC enrichment techniques using a ddPCR identification device for KRAS with a mutation rate of 92% in PDAC and including patients with advanced stages [23].

We found more CTC and clusters in the CVC samples than in the PV samples, opposed to all other previously published results and current understanding. However, the differences between the CTC detected in PV and CVC are not significant. As possible explanations, we propose first that the extraction of portal blood is done using fine needles; in contrast, CVC is done through the central route itself, leading to further destruction of cells in PV. Secondly, the CTC obtained in PV during surgery could be more susceptible to apoptosis; in contrast, central blood CTC, taking longer in the bloodstream, undergo phenotypic changes that would allow them to survive longer. Third, in PV, only newly discharged CTC were detected in the portal bloodstream, but in CVC, CTC could be due to previous discharges that remained in the bloodstream. However, as we have mentioned

above, we found no statistically significant differences; therefore, we understand that this finding is not clinically relevant, unlike CTC levels' impacts on PV associated with survival.

A case-control study would be impossible to perform because negative controls of PV samples would not be ethically approved because there are surgical risks in that sampling. To get an optimal surgical portal vein sample, a bile duct dissection, and transection, it is necessary; this dissection is only possible in selected surgeries such as duodenopancreatectomy, hepaticojejunostomy, or liver transplantation. Unfortunately, most of these procedures are done in patients with cancer or liver cirrhosis in whom hepatocarcinoma is presented. Still, we could not consider them true negative because CTC were likely related to hepatocarcinoma. On the other hand, regardless of this group, we included CVC samples from a non-neoplastic control group based on their clinical history, such as those undergoing cardiac surgeries. The control patients recruited had no oncology history, and the sample was extracted from the pre-implanted CVC before cardiac surgery. These patients had 0.87 ± 0.39 CTC/mL and neither cluster with the methodology performed.

CTC inside a cluster is much higher in G3 than in G1-2 in both samples. Once pancreatic cancer cells invade capillaries in the tumor tissue, they can enter portal veins for distal metastasis, such as metastasis to the liver and lung. Low-grade cancers (G1) tend to grow and spread more slowly than high-grade (G3) cancers. Most of the time, Grade 3 pancreas cancers tend to have a poor prognosis compared to Grade 1 or 2 cancers [1-3]. CTC clusters are highly metastatic. Acetato et al. have shown that CTC clusters in metastatic patients were related to shorter survival [24]. A cluster can include other cells, such as platelets, immune cells, and cancer-associated fibroblasts, providing a local microenvironment that protects CTC on the cluster and facilitates colonization [25]. Therefore, the quantification of the clustered-CTC could add relevant prognostic information.

In both samples, the value of CA 19-9 has a positive relationship with CTC/cluster. Spearman's correlation coefficient allows us to observe that the number of total CTC is directly related to the size of the tumor. The more significant the cancer, the higher the total CTC number for both blood samples. However, a critical fact that allows us to glimpse the physiology of CTC is that clusters and the number of CTC of clusters have an indirect relationship for CVC and direct for PV. The blood sample in PV is taken closer to the single primary tumor; these findings would allow us to suggest that the clusters decrease in size in the journey from the portal vein, through the liver, to the bloodstream, decreasing the number of cells inside and releasing them as free CTC, therefore. However, the physical location of the CTC changes, the total number remains constant and in direct relation to the size of the tumor. As observed in other studies, in patients with early stages [26-28], none of the CTC evaluated parameters correlated with preoperative CA 19-9 or tumor size/TNM stage measured by CT scan either from CVC or PV. However, we found for the first time that the cluster number (>20 clusters/mL) and the CTC inside a cluster (>64 CTC) measured in PV correlated with a negative degree of tumor differentiation in the biopsy. These findings could guide the preoperative diagnosis when it is impossible to perform a preoperative biopsy.

Currently, the correlation of CTC values with progression-free survival or hepatic metastases in non-advanced pancreatic adenocarcinoma remains controversial [7,26-30]. For the survival and disease-free period analysis in our study, the cut-off was adjusted to the 33rd percentile (p33), and then we determined that the CTC's cut-off was 185 cells, and cluster number's cut-off [15]. As in other studies [7,31], the disease-free time in metastases appearance and local recurrences was lower in patients with values above the cut-off in CTC and clusters, although the differences were not statistically significant. Thus, we could not conclude that CTC and cluster levels are predictors of metastasis or local recurrence in the follow-up of patients in our study. In the multivariate analysis, $CTC \geq 185$ in portal blood (HR 4.4) and vascular invasion (HR 3.6) were independent predictors for survival. However, related to OS, patients with more than 185 CTC and 15 clusters in PV had significantly lower survival. These findings were not observed in CVC determinations.

White et al. have described that the number of CTC in PV correlates with survival. Still, this work has been carried out in different stages of the PDAC, with another isolation method and manual counting, which explains why they have found CTC in only 71% of the PV samples [22]. In coincidence with the work of White et al., the difference would be given by the methodology used since studies comparing CellSearch® and Isoflux™ demonstrated that it is up to 8 times more sensitive, which would explain the high number [13]. Finding a 100% positivity rate, we thought these cells could be contaminated with epithelial cells, and therefore we performed thorough quality checks. However, the originality of our work is given in the clinical sensitivity that we have demonstrated through a cut-off that allows us to discriminate the forecast of the disease with some reliability. Consequently, the presence of false-positive endothelial cells would not be viable because CK is not expressed in these cells; therefore, we consider such a false positive to be unlikely.

There are no differences in PV between the number of CTC/mL and cluster/mL about the degrees of resection R0 and R1 (U-Mann Whitney p -value = 0.8556 and 0.637, respectively).

Patients with metastases were excluded, but patients who developed metastases during follow-up were analyzed. The study's objective was to evaluate the CTC as part of an intraoperative liquid biopsy with a single non-disseminated tumor. By definition, a liquid biopsy must be obtained by non-invasive methods. Although getting blood from PV is clinically invasive, as all patients included in this study were susceptible to surgery as part of their treatment, we consider that the analyses of CTC from PV did not involve an additional invasive process.

Our study found that the determination of CTC and clusters in PV were better than in CVC as prognostic markers in patients with early-stage adenocarcinoma in the head of the pancreas. Therefore, cluster determinations and the number of CTC inside a cluster in PV could be helpful to assess the degree of differentiation of pancreatic carcinoma. The number of free CTC in PV would be beneficial to determine the long-term prognosis before the therapeutic decision. Given the low number of patients, this work is a hypothesis generator that determines that CTC presence in PV could be a prognostic factor to predict poor prognosis in early pancreatic cancer. To validate this proposal, these results need validation with a larger patient population and a longer follow-up.

5. Conclusions

CTC presence in PV could be a significant prognostic factor to predict poor prognosis in early pancreatic cancer. In addition, the number of CTC and clusters correlate to a tumor negative differentiation degree and, therefore, could be used as a diagnostic biomarker for early pancreatic cancer.

Author Contributions: Study conception and design: J.P.-R. Writing—review, and editing: J.P.-R., V.D. and M.J.S. Acquisition of samples: G.S., J.T., L.M., C.B., C.C.-F., J.M.A., F.A., F.J.G.-F. and M.A.G.-B. Sample processing and counting: S.P., F.J.C.-C., H.C.M. and P.V. Acquisition of data: F.J.G.-F., I.G. and M.R. Analysis and interpretation of data: J.P.-R., S.P. and J.T. Funding acquisition: J.P.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Carlos III Health Institute (Health Research Fund) grant number PI16/01465 and PI19/01821 (Co-financed by the European Regional Development Fund “A way to make Europe”).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by “Comité Ético de Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío” (protocol code PI16/01465, 21 December 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Garrido-Laguna, I.; Hidalgo, M. Pancreatic cancer: From state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 319–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Álamo, J.M.; Marín, L.M.; Suárez, G.; Bernal, C.; Serrano, J.; Barrera, L.; Gómez, M.A.; Muntané, J.; Padillo-Ruiz, J. Improving outcomes in pancreatic cancer: Key points in perioperative management. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 14237–14245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Sabater, L.; Cugat, E.; Serrablo, A.; Suarez, G.; Padillo, J. Does the artery-first approach improve the rate of r0 resection in pancreatoduodenectomy? A multicenter, randomized, controlled trial. *Ann. Surg.* **2019**, *270*, 738–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Groot-Koerkamp, B.; Rahbari, N.N.; Buchler, M.W.; Koch, M.; Weitz, J. Circulating tumor cells and prognosis of patients with resectable colorectal liver metastases or widespread metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Ann. Surg. Oncol.* **2013**, *20*, 2156–2165. [[CrossRef](#)]
5. Micalizzi, D.S.; Maheswaran, S.; Haber, D.A. A conduit to metastasis: Circulating tumor cell biology. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 1827–1840. [[CrossRef](#)]
6. Jiao, L.R.; Apostolopoulos, C.; Jacob, J.; Szydlo, R.; Johnson, N.; Tsim, N.; Habib, N.A.; Coombes, R.C.; Stebbing, J. Unique Localization of Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatic Metastases. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 6160–6165. [[CrossRef](#)]
7. Tien, Y.W.; Kuo, H.C.; Ho, B.I.; Chang, M.C.; Chang, Y.T.; Cheng, M.; Chen, H.L.; Liang, T.Y.; Wang, C.F.; Huang, C.Y.; et al. High Circulating Tumor Cell count in portal vein predicts liver metastasis from periampullary or pancreatic cancer. *Medicine* **2016**, *95*, e3407. [[CrossRef](#)]
8. Liu, X.; Li, C.; Li, J.; Yu, T.; Zhou, G.; Cheng, J.; Li, G.; Zhou, Y.; Lou, W.; Wang, X.; et al. Detection of CTC in portal vein was associated with intrahepatic metastases and prognosis in patients with advanced pancreatic cancer. *J. Cancer* **2018**, *9*, 2038–2045. [[CrossRef](#)]
9. Seufferlein, T.; Mayerle, J. Pancreatic cancer in 2015: Precision medicine in pancreatic cancer—fact or fiction? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *13*, 74–75. [[CrossRef](#)]
10. Song, B.G.; Kwon, W.; Kim, H.; Lee, E.M.; Han, Y.M.; Kim, H.; Byun, Y.; Lee, K.B.; Lee, K.H.; Lee, K.T.; et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Prospective Evaluation as a Prognostic Marker. *Front. Oncol.* **2021**, *10*, 616440. [[CrossRef](#)]
11. Adsay, N.V.; Basturk, O.; Saka, B.; Bagci, P.; Ozdemir, D.; Balci, S.; Sarmiento, J.M.; Kooby, D.A.; Staley, C.; Maithel, S.K.; et al. Whipple made simple for surgical pathologists: Orientation, dissection, and sampling of pancreaticoduodenectomy specimens for a more practical and accurate evaluation of pancreatic, distal common bile duct, and ampullary tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **2014**, *38*, 480–493. [[CrossRef](#)]
12. Verbeke, C.S.; Gladhaug, I.P. Resection margin involvement and tumor origin in pancreatic head cancer. *Br. J. Surg.* **2012**, *99*, 1036–1049. [[CrossRef](#)]
13. Agerbæk, M.Ø.; Bang-Christensen, S.R.; Yang, M.H.; Clausen, T.M.; Pereira, M.A.; Sharma, S.; Ditlev, S.B.; Nielsen, M.A.; Choudhary, S.; Gustavsson, T.; et al. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3279. [[CrossRef](#)]
14. Calero-Castro, F.J.; Pereira, S.; Villanueva, P.; de la Cruz-Ojeda, P.; Navarro-Villarán, E.; Suarez Artacho, G.; Tinoco-González, J.; Cepeda-Franco, C.; Borrero, J.J.; Dios Barbeito, S.; et al. The use of the Hough 's transform algorithm to count Circulating Tumor Cells from patients with pancreatic cancer. *Cancers* **2021**, in press.
15. Mukaka, M.M. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med. J.* **2012**, *24*, 69–71.
16. Altman, D.G.; Lausen, B.; Sauerbrei, W.; Schumacher, M. Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1994**, *86*, 829–835. [[CrossRef](#)]
17. Arnolettia, J.P.; Fanaianb, N.; Rezac, J.; Sausea, N.; Almodovara, A.J.; Srivastavaa, M.; Pateld, S.; Veldhuisd, P.P.; Griffitha, E.; Shaoa, Y.P.; et al. Pancreatic and bile duct cancer circulating tumor cells (CTC) form immune-resistant multi-cell type clusters in the portal venous circulation. *Cancer Biol. Ther.* **2018**, *19*, 887–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Bausch, D.; Thomas, S.; Mino-Kenudson, M.; Fernandez-del, C.C.; Bauer, T.W.; Williams, M.; Warshaw, A.L.; Thayer, S.P.; Kelly, K.A. Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 302–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Barriere, G.; Fici, P.; Gallerani, G.; Fabbri, F.; Zoli, W.; Rigaud, M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: Characterization of cell subpopulations. *Ann. Transl. Med.* **2014**, *2*, 109. [[PubMed](#)]
20. Malapelle, U.; Pisapia, P.; Addeo, A.; Arrieta, O.; Bellosillo, B.; Cardona, A.F.; Cristofanilli, M.; de Miguel-Perez, D.; Denninghoff, V.; Durán, I.; et al. Liquid Biopsy from research to clinical practice: Focus on Non-Small Cell Lung Cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2021**, *11*, 1–14. [[CrossRef](#)]
21. Hugenschmidt, H.; Labori, K., Jr.; Borgen, E.; Brunborg, C.; Schirmer, C.B.; Seeberg, L.T.; Naume, B.R.; Wiedswang, G. Preoperative ctc-detection by cellsearch[®] is associated with early distant metastasis and impaired survival in resected pancreatic cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 485. [[CrossRef](#)]
22. White, M.G.; Lee, A.; Vicente, D.; Hall, C.; Kim, M.P.; Katz, M.H.G.; Lee, J.E.; Ikoma, N.; Lucci, A.; Tzeng, C.W. Measurement of portal vein blood circulating tumor cells is safe and may correlate with outcomes in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **2021**, *28*, 4615–4622. [[CrossRef](#)]

23. Buscail, E.; Alix-Panabières, C.; Quincy, P.; Cauvin, T.; Chauvet, A.; Degrandi, O.; Caumont, C.; Verdon, S.; Lamrissi, I.; Moranvillier, I.; et al. High clinical value of liquid biopsy to detect circulating tumor cells and tumor exosomes in pancreatic ductal adenocarcinoma patients eligible for up-front surgery. *Cancers* **2019**, *11*, 1656. [[CrossRef](#)]
24. Aceto, N.; Bardia, A.; Miyamoto, D.T.; Donaldson, M.C.; Wittner, B.S.; Spencer, J.A.; Yu, M.; Pely, A.; Engstrom, A.; Zhu, H.; et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **2014**, *158*, 1110–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fabisiewicz, A.; Grzybowska, E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med. Oncol.* **2017**, *34*, 1–10. [[CrossRef](#)]
26. Catenacci, D.V.; Chapman, C.G.; Xu, P.; Koons, A.; Konda, V.J.; Siddiqui, U.D.; Waxman, I. Acquisition of portal venous circulating tumor cells from patients with pancreaticobiliary cancers by endoscopic ultrasound. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 1794–1803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Cauley, C.E.; Pitman, M.B.; Zhou, J.; Perkins, J.; Kuleman, B.; Liss, A.S.; Fernandez-Del Castillo, C.; Warshaw, A.L.; Lillemoe, K.D.; Thayer, S.P. circulating epithelial cells in patients with pancreatic lesions: Clinical and pathologic findings. *J. Am. Coll. Surg.* **2015**, *221*, 699–707. [[CrossRef](#)]
28. Kulemann, B.; Pitman, M.B.; Liss, A.S.; Valsangkar, N.; Fernandez-Del Castillo, C.; Lillemoe, K.D.; Hoepfner, J.; Kenudson, M.M.; Warshaw, A.L.; Thayer, S.P.; et al. Circulating tumor cells found in patients with localized and advanced pancreatic cancer. *Pancreas* **2015**, *44*, 547–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Khoja, L.; Backen, A.; Sloane, R.; Menasce, L.; Ryder, D.; Krebs, M.; Board, R.; Clack, G.; Hughes, A.; Blackhall, F.; et al. A pilot study to explore circulating tumor cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 508–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Jakel, C.; Bergmann, F.; Toth, R.; Assenov, Y.; van der Duin, D.; Strobel, O.; Hank, T.; Klöppel, G.; Dorrell, C.; Grompe, M.; et al. Genome-wide genetic and epigenetic analyses of pancreatic acinar cell carcinomas reveal aberrations in genome stability. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1323. [[CrossRef](#)]
31. Okubo, K.; Uenosono, Y.; Arigami, T.; Mataka, Y.; Matsushita, D.; Yanagita, S.; Kurahara, H.; Sakoda, M.; Kijima, Y.; Maemura, K.; et al. Clinical impact of circulating tumor cells and therapy response in pancreatic cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2017**, *43*, 1050–1055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

Quantification and Characterization of CTCs and Clusters in Pancreatic Cancer by Means of the Hough Transform Algorithm

Francisco José Calero-Castro ^{1,2}, Sheila Pereira ^{1,2}, Imán Laga ^{1,2}, Paula Villanueva ^{1,2}, Gonzalo Suárez-Artacho ^{1,2}, Carmen Cepeda-Franco ^{1,2}, Patricia de la Cruz-Ojeda ², Elena Navarro-Villarán ², Sandra Dios-Barbeito ^{1,2}, María José Serrano ³, Cristóbal Fresno ^{4,*} and Javier Padillo-Ruiz ^{1,2,*}

- ¹ Department of General Surgery, Hospital University Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville/IBiS, 41013 Seville, Spain
² Oncology Surgery, Cell Therapy, and Organ Transplantation Group, Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), Virgen del Rocío University Hospital, University of Seville, 41013 Seville, Spain
³ Department of Liquid Biopsy, Genyo, 18016 Granada, Spain
⁴ Health and Sciences Research Center, Health and Sciences Faculty, Anahuac University, Huixquilucan 52760, Mexico
* Correspondence: cristobal.fresno@anahuac.mx (C.F.); francisco.padillo.sspa@juntadeandalucia.es (J.P.-R.)

Abstract: Circulating Tumor Cells (CTCs) are considered a prognostic marker in pancreatic cancer. In this study we present a new approach for counting CTCs and CTC clusters in patients with pancreatic cancer using the Isoflux™ System with the Hough transform algorithm (Hough-Isoflux™). The Hough-Isoflux™ approach is based on the counting of an array of pixels with a nucleus and cytokeratin expression excluding the CD45 signal. Total CTCs including free and CTC clusters were evaluated in healthy donor samples mixed with pancreatic cancer cells (PCCs) and in samples from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The Isoflux™ System with manual counting was used in a blinded manner by three technicians who used Manual-Isoflux™ as a reference. The accuracy of the Hough-Isoflux™ approach for detecting PCC based on counted events was 91.00% [84.50, 93.50] with a PCC recovery rate of $80.75 \pm 16.41\%$. A high correlation between the Hough-Isoflux™ and Manual-Isoflux™ was observed for both free CTCs and for clusters in experimental PCC ($R^2 = 0.993$ and $R^2 = 0.902$ respectively). However, the correlation rate was better for free CTCs than for clusters in PDAC patient samples ($R^2 = 0.974$ and $R^2 = 0.790$ respectively). In conclusion, the Hough-Isoflux™ approach showed high accuracy for the detection of circulating pancreatic cancer cells. A better correlation rate was observed between Hough-Isoflux™ approach and with the Manual-Isoflux™ for isolated CTCs than for clusters in PDAC patient samples.

Keywords: circulating tumor cell; cluster; pancreatic cancer; Hough transform



Citation: Calero-Castro, F.J.; Pereira, S.; Laga, I.; Villanueva, P.; Suárez-Artacho, G.; Cepeda-Franco, C.; de la Cruz-Ojeda, P.; Navarro-Villarán, E.; Dios-Barbeito, S.; Serrano, M.J.; et al. Quantification and Characterization of CTCs and Clusters in Pancreatic Cancer by Means of the Hough Transform Algorithm. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4278. <https://doi.org/10.3390/ijms24054278>

Academic Editor: Mehran Ghaderi

Received: 31 December 2022

Revised: 25 January 2023

Accepted: 26 January 2023

Published: 21 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a tumor with poor prognosis due to the high rate of early distant metastasis [1]. Liquid biopsy is a way of obtaining tumor information as a tool for personalized medicine [2–5]. This technique includes several determinations. One of them is circulating tumor cell (CTC) detection [3,6]. CTCs are released from the primary solid tumor to the bloodstream and may provide clinically relevant information for cancer diagnosis, prognosis, and treatment [7,8]. Therefore, in patients with PDAC, the detection of CTCs and clusters could be really challenging.

Different technologies for CTC isolation from normal hematopoietic cells, such as erythrocytes and leukocytes, have been described [9–13] using differentiating cell parameters, such as physical properties, flow, or elasticity characteristics. Moreover, the differential expression of biological factors, such as putative tumor-associated antigens (TAAs) or simply markers of epithelial vs. mesenchymal/hematopoietic transition have been developed [9]. One of these technologies is the IsoFlux™ System (Fluxion Biosciences, Inc., Alameda, CA,

USA). The IsoFlux™ System is a semiautomatic platform that facilitates CTC enrichment by using immunomagnetic positive selection, along with microfluidics [14,15]. This system has been used to successfully isolate CTCs from many cancers [16–23]. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is a molecule found on the cell surface that shows high expression levels in solid cancers. In order to detect this molecule, ferromagnetic particles coated with an antibody against EpCAM have been used to enrich CTCs from blood samples. Once enriched, the distinction between CTCs and hematopoietic cells is achieved by means of different approaches, such as the Hoechst 33342 staining, which binds to cell nuclear DNA. Additional antibodies against anti-cytokeratin (CK) and anti-leukocyte antigens, usually CD45, allow for the differentiation of epithelial cells and leukocytes, respectively [9,10,24]. However, the final step in the immunomagnetic separation systems is manual, since a technician must review each subsequent microimage generated to determine if each counted event is Hoechst 33342-positive, CK-positive, and CD45-negative [9].

In addition, it is really important that these methods allow for the detection of the presence of a CTC group, which is labeled as a CTC cluster [9,25,26]. Clusters have been associated with high metastatic potential and a shorter lifespan [26]. A CTC cluster can present a heterogenic cell composition, with platelets, immune cells, or cancer-associated fibroblasts. This cell architecture provides a local microenvironment that shelters clustered CTCs and smooths the path for colonization [27]. Therefore, CTC cluster quantification is a potentially useful parameter to take into consideration as a relevant prognostic marker [9,27].

The Hough transform, described in 1972, is a technique that locates shapes in images. Hough transform is an algorithm that effectively detects straight lines and curves in an image and is widely used in computer processes. Different studies have successfully used the Hough transform to grasp the edge of cells [28–32]. The Hough transform is based on a solid mathematical theory that has been broadly applied in many clinical fields [28,30,31,33–35].

Here, we present a novel semi-automatized technique based on the Hough transform and coupled with the Isoflux™ System (Hough-Isoflux™) that allows for the counting of free CTCs and clustered CTCs isolated from whole blood samples of patients with PDAC.

2. Results

2.1. Experimental Validation

2.1.1. Isolated Pancreatic Cancer Cell (PCC) Evaluation

The median Hough-Isoflux™ sensitivity and accuracy for detecting PCC in the counted events were 89.00% [82.50, 91.00] and 91.00% [84.50, 93.50], respectively. In samples from healthy patients that were taken as negative controls (samples that were not mixed with PCC), only 1 [0, 4] lymphocyte was detected. Figure 1 shows PCC and CTC characterization with specific staining.

Table 1 presents the results of the PCC included in the control groups, as well as the recovery rate obtained with the manual tumor cell counting of the Isoflux™ system (Manual-Isoflux™) and with the Hough transform approach. Although the recovery rate obtained with the Hough-Isoflux™ approach was lower than that with the Manual-Isoflux™, differences were not significant ($80.75 \pm 16.41\%$ vs. $82.44 \pm 9.55\%$; $p = 0.801$). The correlation coefficients observed between control PCC and both techniques were almost similar. In the Manual-Isoflux™, we obtained a correlation coefficient of $R^2 = 0.988$, a slope of 0.696 (95% CI, 0.627–0.764), and an interception of 45.74 (95% CI, –0.553–92.040) (Figure 2a). The Hough-Isoflux™ approach provided a correlation coefficient of $R^2 = 0.974$, a slope of 0.649 (95% CI, 0.553–0.744), and an interception of 44.380 (95% CI, –20.010–108.800) (Figure 2b). A high correlation between both the Manual-Isoflux™ and Hough-Isoflux™ techniques was observed obtaining an $R^2 = 0.991$, a slope of 0.935 (95% CI 0.857, 1.014), and an interception of 0.614 (95% CI, –39.180–40.410) (Figure 2c).

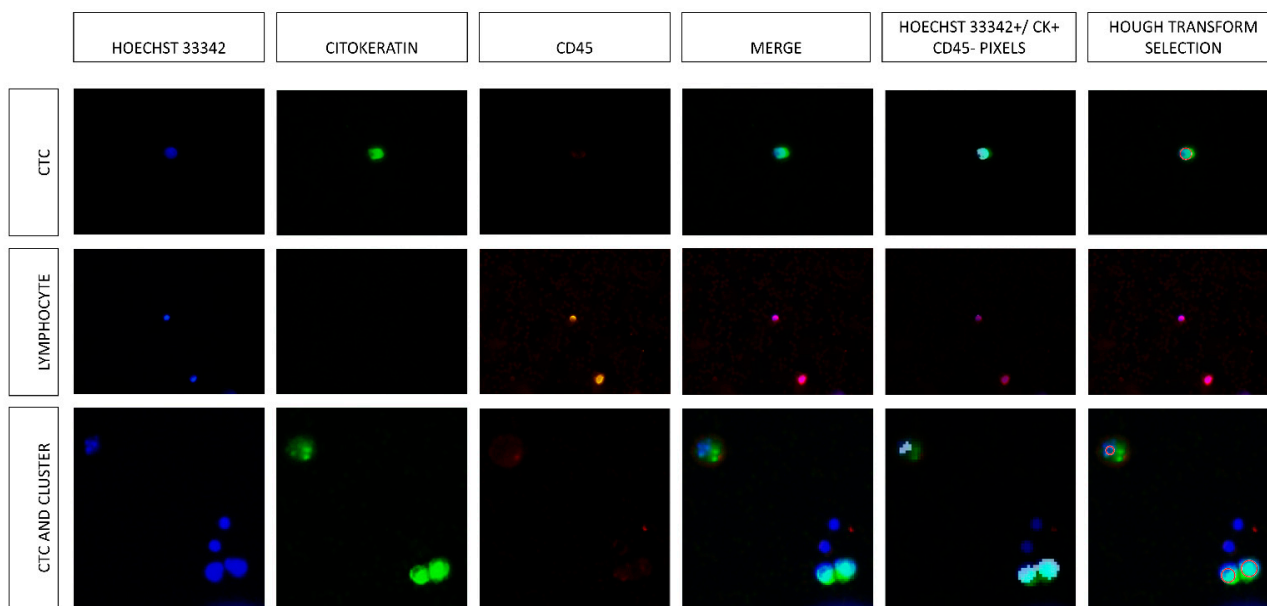


Figure 1. Row one shows the CTC staining characterized by Hoechst 33342+/CK+/CD45-. The fifth image in the first row shows the selection of pixels with CTC staining, and the last photo shows a CTC surrounded by a red circumference counted by the Hough transform. Row two shows the staining of some lymphocytes. Row three shows a free-CTC and a cluster consisting of two cells. Columns five and six show that the Hough transform algorithm did not count the CTCs if the element had no CK staining.

Table 1. Total counted PCCs with the Manual-Isoflux™ System and Hough-Isoflux™ System. Data are presented with the mean and S.D.

Control Density PCC	Counted Cells (n)			Recovery from Control (%)		
	Manual-Isoflux™	Hough Transform-Isoflux™	p-Value	Manual-Isoflux™	Hough Transform-Isoflux™	p-Value
No added PCC	3.67 ± 2.60	6.40 ± 4.34	0.263	-	-	-
100	105.33 ± 8.39	98.00 ± 25.98	1.000	89.92 ± 10.98	88.43 ± 22.75	0.924
300	302.67 ± 69.97	291.00 ± 68.51	0.847	84.04 ± 2.83	86.17 ± 11.45	0.782
1000	811.00 ± 86.00	753.00 ± 129.00	0.552	73.16 ± 3.50	67.66 ± 6.29	0.256

2.1.2. Cluster Evaluation

The results of cluster, clustered-PCC, and free-PCC counting are presented in Table 2. There were no significant differences between techniques for detecting clusters with an overall $R^2 = 0.902$ correlation rate, a slope of 0.628 (95% CI, 0.443–0.8131), and interception of -0.056 (95% CI, -2.629 – 2.513) (Figure 3a). However, some significant differences were observed for PCC clusters with moderate and high tumor cell concentrations (300–1000 PCCs). The correlation coefficient observed between Manual-Isoflux™ and Hough-Isoflux™ techniques for clustered-PCC counts was $R^2 = 0.940$ with a slope of 0.586 (95% CI, 0.454–0.719), and the interception was -0.408 (95% CI, -5.179 – 4.363) (Figure 3b).

Finally, regarding the remaining free-PCC, both techniques also counted similar PCC numbers with a high correlation rate, as shown in Figure 3c ($R^2 = 0.993$; slope of 0.964 [95% CI, 0.893–1.035], and an interception of -1.165 [95% CI, -34.76 – 32.43]).

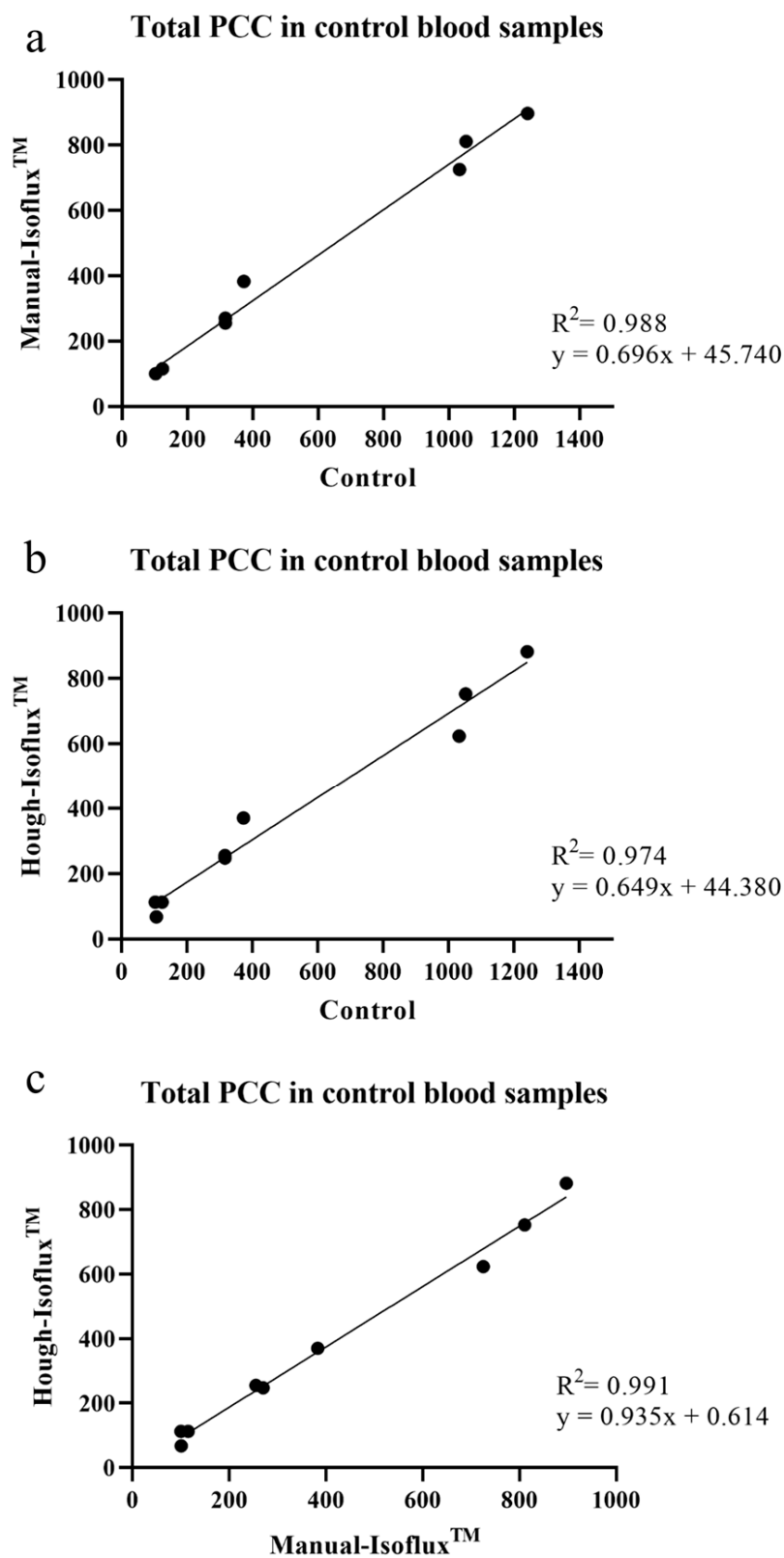


Figure 2. (a). Correlation of total PCCs in control blood samples between control and Manual-Isoflux™ System. (b). Total PCCs in control blood samples between control and Hough-Isoflux™ System. (c). Total PCCs in control blood samples between Manual-Isoflux™ System and Hough-Isoflux™ System.

Table 2. Breakdown of clusters, clustered-PCCs, and free-PCCs. Data are presented with the mean and SD.

Control Density PCC	Clusters (n)			Clustered-PCCs (n)			Free-PCCs (n)		
	Manual-Isoflux TM	Hough Transform-Isoflux TM	<i>p</i> Value	Manual-Isoflux TM	Hough Transform-Isoflux TM	<i>p</i> Value	Manual-Isoflux TM	Hough Transform-Isoflux TM	<i>p</i> Value
No added PCC	0	0	-	0	0	-	3.67 ± 2.60	6.40 ± 4.34	0.263
100	0.33 ± 0.58	0.67 ± 1.15	1.000	0.67 ± 1.15	1.33 ± 2.31	1.000	104.67 ± 7.23	96.67 ± 24.91	0.621
300	7.00 ± 1.73	3.00 ± 2.00	0.100	15.00 ± 3.61	6.00 ± 4.00	0.044	287.67 ± 72.34	285.00 ± 65.18	0.964
1000	22.67 ± 4.51	15.00 ± 00	0.042	60.00 ± 10.00	36.00 ± 1.00	0.014	751.00 ± 96.00	717.00 ± 130.00	0.736

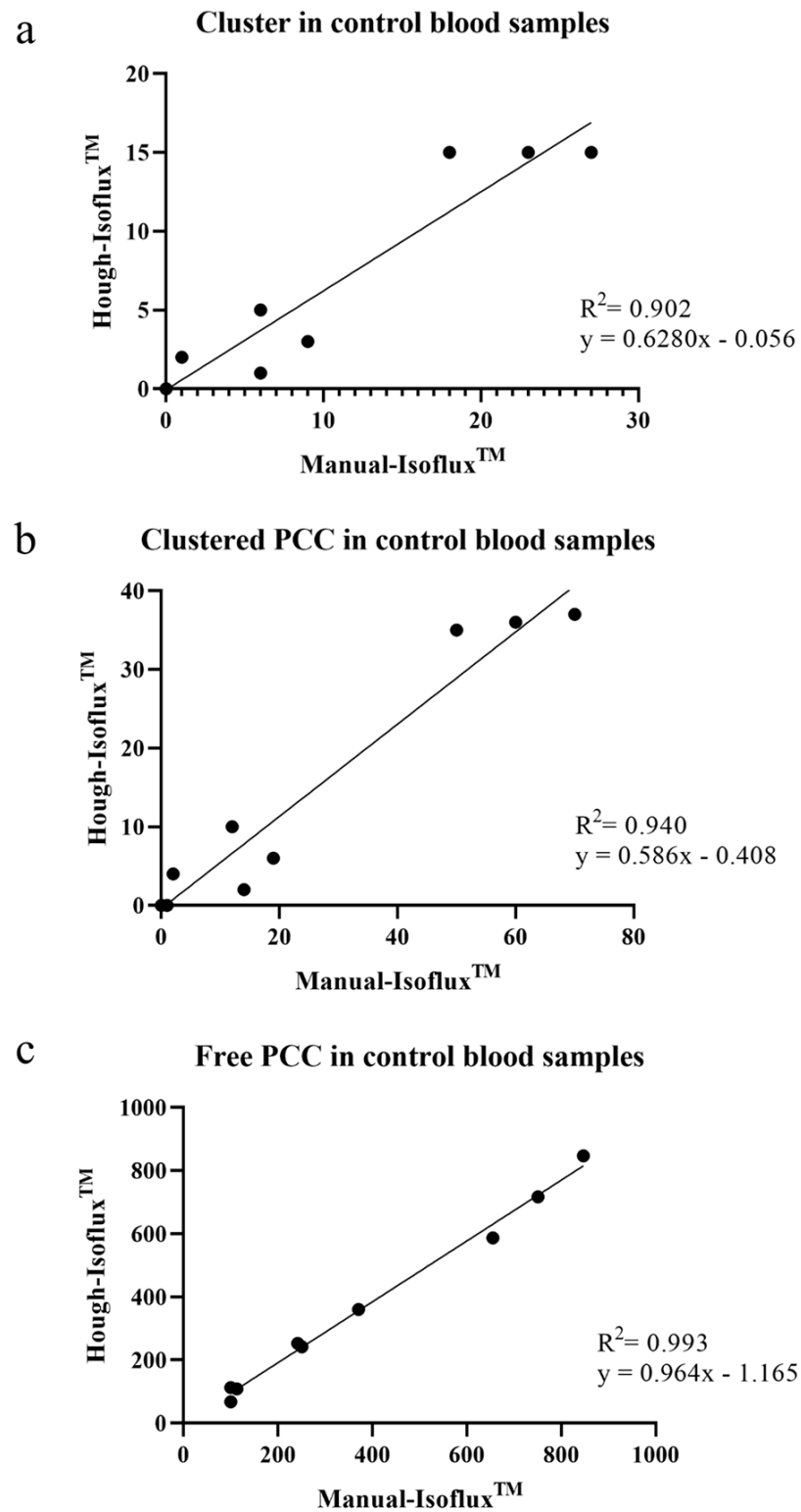


Figure 3. (a). Cluster measurement in control blood samples: Manual-Isoflux™ System vs. Hough-Isoflux™ System. (b). Clustered-PCC measurement in control blood samples: Manual-Isoflux™ System vs. Hough-Isoflux™ System. (c). Free PCC measurement in control blood samples: Manual-Isoflux™ System vs. Hough-Isoflux™ System.

2.2. Clinical Validation

CTCs and Cluster Measurements in Patients with PDAC

Fifty samples from patients with PDAC were evaluated for CTCs and cluster detection. The results are shown in Table 3. There were no significant differences between the Manual-Isoflux™ and the Hough-Isoflux™ approaches.

Table 3. CTCs were detected by the Manual-Isoflux™ System and by the Hough transform-Isoflux™ System algorithm in patients with pancreatic cancer.

Group	Manual-Isoflux™	Hough-Isoflux™	p-Value
Total-CTCs/mL	192.00 (70, 513)	152 (83.25, 487.50)	0.912
Cluster/mL	8.50 (2, 22.50)	10 (3.75, 26.25)	0.437
Clustered-CTCs/mL	25 (5.75, 77.50)	24.50 (8.75, 59.75)	0.942
Free-CTCs/mL	146.00 (54.50, 388.25)	124.5 (72.50, 422)	0.994

Figure 4 represents the CTCs counted by the Manual-Isoflux™ System and by the Hough-Isoflux™ System. High correlation coefficients were demonstrated in the total-CTCs ($R^2 = 0.972$) and free-CTCs ($R^2 = 0.974$). The slopes obtained through the linear regression study were close to 1:0.978 (95% CI, 0.930–1.025) with an interception of 0.677 (95% CI, −24.160, 22.810) in the total-CTCs (Figure 4a). The slope was 1.004 (95% CI, 0.955–1.052) with an interception of 2.470 (95% CI, −18.130–23.070) for the free-CTCs (Figure 4b).

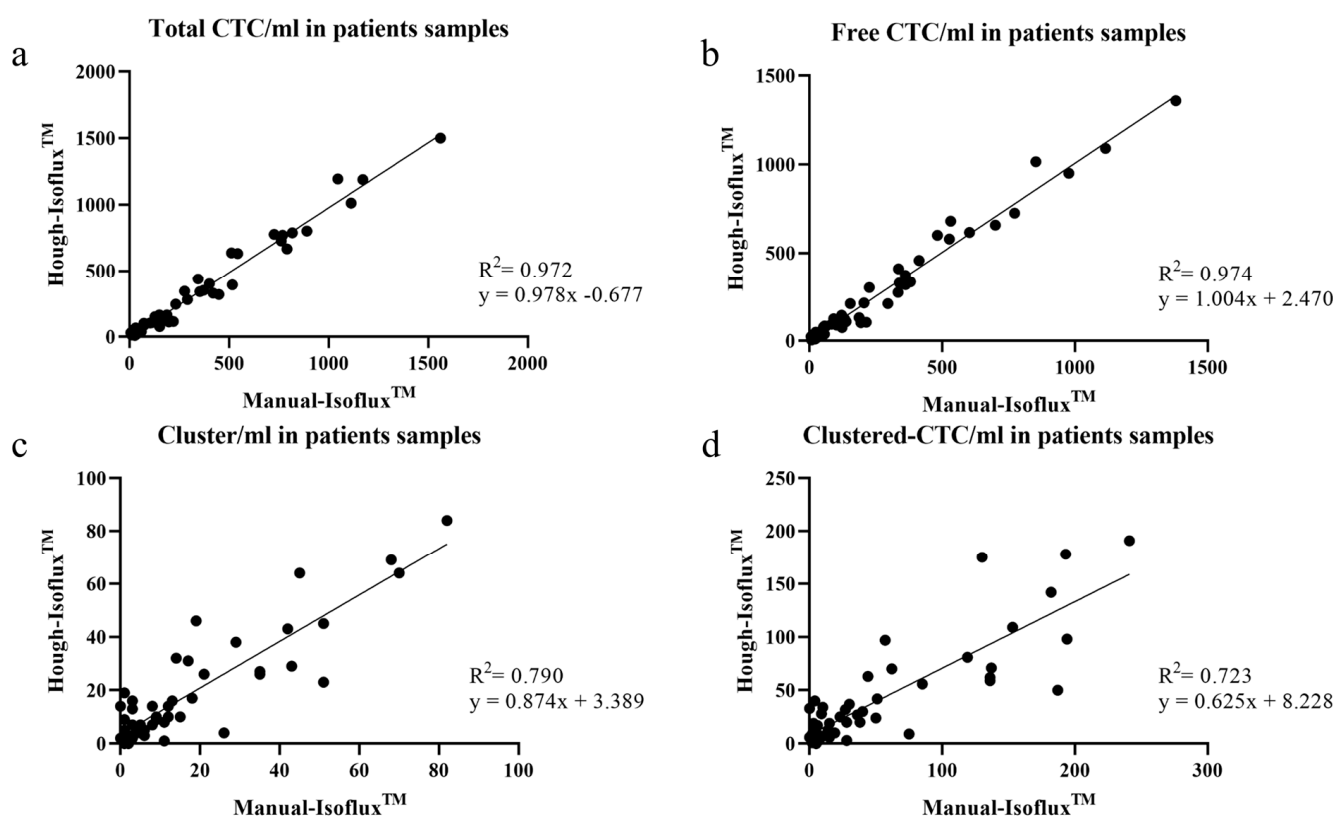


Figure 4. Correlation plot of CTC/mL in pancreatic cancer patient samples counted with the Manual-Isoflux™ System and with the Hough-Isoflux™ System. (a). Total-CTC correlation. (b). Free-CTC correlation. (c). Cluster correlation. (d). Clustered-CTC correlation.

The cluster and clustered-CTC correlation coefficients (R^2) between both techniques were 0.790 and 0.723, respectively. For clusters (Figure 4c), we obtained a slope of 0.874 (95% CI, 0.743–1.005) and an interception of 3.389 (95% CI, –0.021–6.799). For clustered-CTCs (Figure 4d), a slope of 0.625 (95% CI, 0.513–0.737) and an interception of 8.228 (95% CI, –1.148–17.600) was obtained.

2.3. CTC Size and Cluster Size

The Hough-IsofluxTM System allows for the measurement of CTC and cluster sizes. In control samples, the diameter of the free-PCCs was $7.71 \pm 0.50 \mu\text{m}$, while that of the clustered-PCCs was $11.06 \pm 1.17 \mu\text{m}$. The cluster size was $383.36 \pm 65.59 \mu\text{m}^2$. On the other hand, the diameter of free-CTCs in patient samples was $7.99 \pm 1.55 \mu\text{m}$, while clustered-PCCs had a diameter of $10.46 \pm 1.59 \mu\text{m}$. Clusters in patient samples had a surface area of $562.92 \pm 291.50 \mu\text{m}^2$.

3. Discussion

Over the last few years, it has been demonstrated that the detection of CTCs can be related to patients' survival. There are several techniques for CTC isolation based on different principles and yields [9–13]. In our case, for CTC isolation, we defined the tumor cell population following the criteria previously published in other works [21,36,37]. EpCAM is one of the most expressed proteins in CTCs and is also overexpressed in tumors and other cells. After the isolation of potential tumoral cells using the EpCAM marker, we identified, via fluorescence microscopy, the actual CTCs as CK-positive, Hoechst 33342-positive, and CD45-negative. This allowed us to avoid the counting of the frequent CD45-positive PMBC contaminants of blood samples [38], as well as red blood cells and platelets, with an absent nucleus. Only nucleated cells with CK marker expression and no CD45 signal were considered the tumor cells of interest. Currently, there are different devices for the isolation of CTCs from enrichment with EpCAM [10–13,39]. Among them, CellSearch[®] is currently the only device approved by the FDA for monitoring patients with metastatic breast, colorectal, and prostate cancer [38,39]. However, like Rarecyte[®], these are semi-automatic devices since they require a technician to assess whether the candidate events are CTCs [11,13]. Previous work has used CellSpotter[®] Analyzer [10,40] and CellTracks[®] [11] in combination with different isolation methods to automate the process. It has also been described that Rarecyte[®] has been used in combination with CyteFinder[®] [13]. Although this combination of devices and software provides sensitivity, accuracy, and an elevated correlation in the total CTCs detected, supervision by a technician is always necessary. In the present study, the reference measurements have been also made by three experienced technicians. Currently, the new techniques for the isolation and enrichment of CTCs are being based on the use of devices that combine microscopy and cytometry techniques [41–43] to allow automated measurements avoiding potential bias. However, these samples cannot be fixed as we did in the present study due to the use of immunofluorescence.

As previously reported [44,45], we chose the EpCAM-IsofluxTM System because this device could isolate more CTCs than CellSearch[®], and both of them use the same isolation target, EpCAM. Nevertheless, a straight-forward comparison of the CTC isolation performed using the two platforms is challenging, due to the fact that they use different antibody clones and different magnetic beads for the capture process. Thanks to the micrometer-scale beads included in the IsoFluxTM System, the magnetic moment generated is sufficient for capturing even cells with low expression levels of markers [44]. Moreover, many works have reported the good results for the IsofluxTM when isolating CTCs from different cancer types [16–23]. For the counting of isolated events using the IsofluxTM, the IsofluxTM Cytation Imager software is frequently used, but no evidence has been found in terms of its sensitivity and accuracy.

Our proposed technique, like many approaches to isolate CTCs, is a semi-automatic method in which user interaction is only required for threshold specification and noise removal. Previous

works use different algorithms to detect cells, such as edge detection [46–48] or concavity detection. Edge detection can be performed based on Laplacian, Gaussian, or Canny algorithms.

Therefore, this paper presents a study in which we relied on the Hough transform-Isoflux™ System to perform the semi-automatic counting of CTCs detected based on EpCAM staining. First, when we evaluated the coefficient of variation (CV) of the novel approach, we found that the CV measured with the Hough-Isoflux™ System did not exceed 2% in CTC detection. This indicates homogeneity in the counting and minimal variation from one count to another based on the same sample.

Since Hough transform is an image analysis technique, it can potentially be coupled to other platforms that isolate CTCs, such as the CellSearch® or CellSpotter® Analyzer, which provide a final image to be analyzed. The markers used can differ between the different approaches, but in general, they should be a molecule or a combination of molecules expressed only in cancer cells. There are specific markers that once detected in blood cells for cancer patients, if the cell is CD45 negative, allow us to infer that we are dealing with a foreign cell and probably a cancerous one. These markers are divided into three groups: epithelial markers (such as EpCAM, cytokeratins, or E-cadherin), mesenchymal markers (such as vimentin, N-cadherin, or Twist1), and stem markers (such as CD44 or ALDH1) [49]. Moreover, some works mentioned more specific markers, such as BRAF^{V600E} and PD-L1 [14]. These markers can be considered in the immunofluorescent step to detect them with a microscope, taking into consideration the wavelength of each marker.

Regarding cancer cell recovery, similar to other approaches [14], the Hough-Isoflux™ System reported an 80.75% rate of pancreatic cell cancer recovery. Moreover, we found a high sensitivity (89.00%) and accuracy (91.00%) for CTC detection, similar to those with other analyzers, such as the CellSpotter® [10], which showed a sensitivity of 85% and an accuracy of 99.7%. Although sensitivity and accuracy showed good results, they are not perfect. In that line of thought, some authors, such as Chen et al. [50], improved their results by combining CTC with CA19-9.

Even though the available literature provides several detection sensibilities, those values are not comparable to those of our study. The reason for that is that we used a high-yield enrichment technique, followed by an automated method of enumeration. This led to the detection of CTC in 100% of the studied samples from patients with early pancreatic cancer.

When the correlation between both techniques was evaluated, high linearity was observed between Manual-Isoflux™ System counting and Hough transform-Isoflux™ System counting. This was observed in both total and free-PCCs in blood from healthy donors, as well as in total and in free-CTCs from patients with pancreatic cancer.

Since clusters are related to tumor metastasis [9,25,26], the determination of clusters is crucial for clinical purposes. In our study, there was a high correlation between both techniques analyzed for cluster detection in experimental PCC, whereas a lesser correlation was found in samples from patients with PDAC. This could be explained because we have included restricted parameters in the software to avoid counting artifacts in the sample. In this sense, we thought that it would be better to improve the accuracy instead to increase the false positives. Moreover, another explanation for the lower correlation coefficients between both the Manual-Isoflux™ System and Hough Transform-Isoflux™ System may be related to the binary mask generated during the data processing after the logical operations performed with each color channel. This binary mask is obtained after the logical multiplication of the blue (Hoechst 33342+) and green (CK+) channels, and with the result, a logical operation is performed with the red channel (CD45+) to discard the cells with CD45 expression. The implementation of this mask is a crucial step for the high sensibility and accuracy in the counts of CTCs, which have a well-defined rounded morphology. Clusters, on the other hand, show irregular shapes with two or more CTCs within them, which often result in overlapping CTCs that are more difficult to identify based on the Hough transform. A potential approach to improve the correlation coefficients could be to increase the sensitivity factor to find overlapping circles in an irregular shape.

However, this factor may count events that are not CTCs or count a CTC more than once. Thus, this interesting point needs further research.

Using the Hough transform-Isoflux™ System, we could determine the CTC and cluster size. However, these measurements are an estimation because we measured the correlation between Hoechst 33342 and CK (Figure 1). CK labeled the cytoplasm, whereas Hoechst 33342 labeled the cell nucleus. Therefore, in some cases, CK was more representative than the correspondence in determining the cell size.

A limitation of our method for this specific clinical approach is that it requires more memory than that in other fields since several images are needed due to the generation of masks. This process can produce images larger than 7000 × 7000 pixels. Therefore, the computational cost of the technique is high. Additionally, Hough transform returns a huge matrix with the cell center and the counted cell size. Nevertheless, according to our experience, Hough transform is simple to implement and can generate results in real-time, which is highly suitable for CTC counting for clinical applications.

In conclusion, the Hough-Isoflux™ System is a good approach for counting CTCs, clusters, and clustered CTCs based on their identification as nucleated cells with EpCAM expression, as well as CK-positive and CD45-negative cells, once they have been isolated with the Isoflux™ System. Moreover, the strategy hereby presented might allow for the counting of other cells of interest by processing image channels depending on the marker expression profile of the cells.

4. Materials and Methods

4.1. Collection of the Samples

In total, 50 samples from 9 patients with adenocarcinoma in the head of the pancreas were enrolled in this study. Following the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines V1.2013 of Pancreatic Cancer and the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging of Pancreatic Cancer, the study included 33.33% of patients with stage I (11.11% IA, 22.22% IB), 44.44% with stage II (33.33% IIA, 11.11% IIB), and 22.22% of patients with stage III disease after a surgical pathology study.

Blood samples from two healthy donor volunteers with nonmalignant diseases were used as a control group. Tubes with EDTA were used to collect blood samples, which were stored at room temperature and processed before 24 h after collection.

4.2. Cell Culture

The pancreatic cancer cell line PANC-1 (ATCC® CRL-1469, Manassas, VA, USA) was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza BE12-604F, Basel, Switzerland), previously supplemented with 10% fetal bovine serum (F7524, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) and 1% Penicillin/Streptomycin (15140122, GIBCO, Waltham, MA, USA). A humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂ was used to grow the cell cultures. Once seeded, cell cultures were washed with phosphate-buffered saline (PBS, H3BE17-516F, Lonza) and trypsinized using Trypsin-EDTA at 0.05% (25300-062, Gibco, Waltham, MA, USA). Pancreatic cancer cells (PCCs) were used to calibrate the method.

4.3. Sample Preparation for Recovery, Accuracy, Sensitivity, and Linearity of PCC Detection

Two different groups were used for accuracy, sensitivity, and linearity experiments. Seven-milliliter samples of blood were collected from a donor with no physical affection (n = 3) and were prepared and mixed with approximately 100, 300, and 1000 PCCs. In the second group, for false-positive assays, 7 mL samples of blood collected from a healthy donor were processed in EDTA tubes. All samples were counted by three blinded expert technicians using the Hough transform algorithm. We defined the Manual-Isoflux™ recovery as the number of manually counted PCCs per control PCC and Hough-Isoflux™ System recovery as the number of Hough transform-Isoflux™ System-counted PCCs per control PCC. Accuracy was defined as well-counted PCCs per Hough transform-Isoflux™ System-counted PCC, whereas sensitivity was defined as well-counted PCCs per control PCCs.

4.4. Reproducibility of CTC Measurements between Duplicate Samples and Multiple Operators

Fifty samples were collected from patients with pancreatic cancer and were processed as we describe in the following section. All samples were counted by three blinded expert technicians (Manual-Isoflux™ System in text) and the Hough transform algorithm- Isoflux™ System after CTC isolation and enrichment was performed as described in Section 4.5.

4.5. Isolation of Circulating Tumor Cells

To enrich blood samples from peripheral mononuclear blood cells, gradient centrifugation with Histopaque®-1119 was used, while the IsoFlux platform was applied for CTC and PCC isolation. The IsoFlux™ System takes advantage of the magnetic moment generated by the micrometer-scale beads that it contains to capture cells, even those with low expression levels of target markers [27]. Moreover, this is an automatic process that increases the capture rate of PCCs and CTCs. For CTC enrichment, the Isoflux™ Epithelial to Mesenchymal Transitions Circulating Tumor Cell Enrichment Kit (EMT Enrichment Kit, Izasa, Catalog N.910-0106, San Diego, CA, USA) was used, where beads targeting epithelial and mesenchymal markers were conjugated with four different antibodies. For the detection of epithelial cells, anti-EpCAM (a highly expressed molecule in solid cancers) and anti-EGFR antibodies are used in the kit, while anti-N-Cadherin and anti-Vimentin were used to target mesenchymal markers. The cells suspended in IsoFlux Binding Buffer were combined with the immunomagnetic beads conjugated with the above-mentioned antibodies and incubated for 90 min at 4 °C, as instructed in the Fluxion protocol. The cell and bead mixture was loaded into the microfluidic cartridge and processed with the Isoflux™ System. Then, in the isolation zone inside the instrument, the cells were exposed to a magnetic field towards which the target cells are attracted with CTC beads attached. The target cells were collected on a removable disk. Once the samples had been processed, fluorescent reagents (Isoflux™ Circulating Tumor Cell Enumeration Kit Izasa Catalog N.910-0093, Fluxion, San Diego, CA, USA) were used to fix and stain the enriched cells. The following antibodies were used: anti-CK-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated, which binds specifically to CK, an intracellular protein typical of epithelial cells; anti-CD45/Indocarbocyanine (Cy3), which is expressed only in leukocytes; and Hoechst 33342, a nucleic acid marker that emits blue fluorescence once it binds to the minor groove of the DNA, where AT-rich regions can be found. For the acquisition of fluorescent images of the stained samples, an Olympus BX-61 Direct Fluorescence microscope was used. In light of the above, CTCs or PCCs are defined as CK+/CD45-/nucleated and morphologically intact cells.

The samples that were not isolated with the IsoFlux were stained with fluorescent reagents (Isoflux™ Circulating Tumor Cell Enumeration Kit Izasa Catalog N.910-0093, Fluxion, San Diego, CA, USA).

4.6. Software Counting Development

4.6.1. Image Pre-Processing

The sample images stained with Hoechst 33342, CK, and CD45 were given as input to the system to be analyzed. The images were collected from normal donors and cancer patients. We used the blue channel (Hoechst 33342), the green channel (CK), and the red channel (CD45). Every track was converted to grayscale by eliminating the hue and saturation element and retaining luminance.

4.6.2. Image Segmentation

The images were converted to binary form using the global Otsu's threshold to minimize the intra-class variance. Pixels with a grayscale value higher than the threshold calculated by Otsu's algorithm were marked as one, while those that did not exceed the threshold were marked as zero. The histogram allowed us to select the threshold if Otsu's value is not high enough. As previously described, CTCs are CK+/CD45-/nucleated cells. Therefore, image pixels that show Hoechst 33342+, CK+, and CD45- are considered CTCs. A logical multiplication between the threshold values of blue and green channels (Hoechst

33342 and CK, respectively) was applied to the images. Finally, we removed the thresholding pixels of channel red (CD45). The goal was to keep the pixels dyed blue and green but not red; for this, binarization of the three channels was carried out. The artifacts from the obtained mask were removed using Matlab tools (such as `imcrop` or `roipoly`, where the user can select one component to delete). Considering that the resolution of the images was $0.75 \text{ pixel}/\mu\text{m}$ and that the size of the CTCs of patients with pancreatic adenocarcinoma is not defined, the size of the CTCs was considered between 5 and $25 \mu\text{m}$, according to studies in other tumors [10]. Image components with a size between 10 and 400 pixels were filtered. If the component size exceeded 400 pixels, it was introduced in a new mask, where the CTCs would be counted in clusters. Another filter was circularity, which must be greater than 0.6; if it was less than that value, the components were transferred to the cluster counting mask (Figure 1).

4.6.3. Image Post-Processing

We multiplied the masks obtained with the green channel (grayscale) to facilitate algorithm counting based on the CK intensities. Finally, using the Hough transform through the `imfindcircles` Matlab function, we measured the components in the initial mask and the clustered CTC mask. This function returned the pixel where the cell centers were and the size of the event. If an element had only the associated center of a circumference of the Hough transform, it was taken as a free-CTC, while if any of the components had two or more pixels as the center of a Hough transform circumference, it would be taken as a cluster with as many cells as centers that had been detected. This methodology was validated by checking the counted event from healthy donors with the Hough transform algorithm. The software determined the number of free-CTCs, clusters, clustered-CTCs, and total CTCs (free and clustered-CTCs). The software showed the average and median size of free-CTCs and clustered-CTCs based on the radius. At the same time, the cluster surface was measured based on the pixel number and the image resolution. An analysis of the measurement's intra-assay coefficient of variation (CV) was provided. Thereby, mean values of CV were $0.42\% \pm 0.33$ for the total-CTCs, $0.30\% \pm 0.37$ for the free-CTCs, $0.72\% \pm 1.25$ for the clusters, and finally, $1.41\% \pm 1.22$ for clustered-CTCs.

4.7. Statistics

An independent student's t-test was performed to compare both counting approaches. When quantitative variables did not show a normal distribution, the Mann-Whitney U test was used for their analysis. To analyze the relationship between counted PCC and CTC techniques, Spearman's rank correlation coefficient (R^2) was used. The required significance was $p < 0.05$. The software used to perform all statistical calculations was the following: IBM Corp. released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp and GraphPad Prism 9.0.0.

5. Conclusions

The Hough transform- IsofluxTM System is a good approach for counting CTCs, clusters, and clustered-CTCs, defined as EpCAM nucleated cells, positive for CK, but CD45-negative, after isolation with the IsofluxTM System.

6. Patents

Given the inventive characteristics of this innovation, this work has been protected as a patent and utility model by the Spanish Patent and Trademark Office with the ID 2112140033157 in Safe Creative as "The use of the Hough's transform algorithm to count Circulating Tumour Cells (CTCs)".

Author Contributions: Study conception and design: J.P.-R., C.F. and M.J.S. Writing—review, and editing: F.J.C.-C., C.F. and J.P.-R. Acquisition of samples: G.S.-A. and C.C.-F. Sample processing and counting: S.P., P.V., I.L., P.d.I.C.-O., E.N.-V. and F.J.C.-C. Acquisition of data: C.F., G.S.-A. and S.D.-B.

Analysis and interpretation of data: J.P.-R., F.J.C.-C. and C.F. Funding acquisition: J.P.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Carlos III Health Institute (Health Research Fund) grant number PI16/01465 and PI19/01821 (co-financed by the European Regional Development Fund “A way to make Europe”).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by “Comité Ético de Investigación de Los Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío” (protocol code PI16/01465, 21 December 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to acknowledge all patients and healthy donors willing to contribute to this study by providing their biological samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pantel, K.; Alix-Panabières, C. Liquid biopsy and minimal residual disease—Latest advances and implications for cure. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16*, 409–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Connors, D.; Allen, J.; Alvarez, J.D.; Boyle, J.; Cristofanilli, M.; Hiller, C.; Keating, S.; Kelloff, G.; Leiman, L.; McCormack, R.; et al. International liquid biopsy standardization alliance white paper. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2020**, *156*, 103112. [[CrossRef](#)]
- Rolfo, C.; Cardona, A.F.; Cristofanilli, M.; Paz-Ares, L.; Diaz Mochon, J.J.; Duran, I.; Raez, L.E.; Russo, A.; Lorente, J.A.; Malapelle, U.; et al. Challenges and opportunities of cfDNA analysis implementation in clinical practice: Perspective of the International Society of Liquid Biopsy (ISLB). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2020**, *151*, 102978. [[CrossRef](#)]
- Malapelle, U.; Pisapia, P.; Addeo, A.; Arrieta, O.; Bellosillo, B.; Cardona, A.F.; Cristofanilli, M.; De Miguel-Perez, D.; Denninghoff, V.; Durán, I.; et al. Liquid biopsy from research to clinical practice: Focus on non-small cell lung cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2021**, *21*, 1165–1178. [[CrossRef](#)]
- Anfossi, S.; Babayan, A.; Pantel, K.; Calin, G.A. Clinical utility of circulating non-coding RNAs—An update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 541–563. [[CrossRef](#)]
- Lai, C.-H.; Chang, Y.-C. Microfluidic Capture and Multiplex Immunofluorescence of Circulating Tumor Cells to Identify Cancer of Origin. In *Circulating Tumor Cells; Methods in Molecular Biology*; Springer: Berlin, Germany, 2017; Volume 1634, pp. 1–19.
- Yap, T.A.; Lorente, D.; Omlin, A.; Olmos, D.; de Bono, J.S. Circulating tumor cells: A multifunctional biomarker. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2553–2568. [[CrossRef](#)]
- Paoletti, C.; Hayes, D.F. Circulating Tumor Cells. In *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer*; Stearns, V., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 235–258. [[CrossRef](#)]
- Allard, W.J.; Matera, J.; Miller, M.C.; Repollet, M.; Connelly, M.C.; Rao, C.; Tibbe, A.G.; Uhr, J.W.; Terstappen, L.W. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2004**, *10*, 6897–6904. [[CrossRef](#)]
- Andree, K.C.; van Dalum, G.; Terstappen, L.W.M.M. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol. Oncol.* **2016**, *10*, 395–407. [[CrossRef](#)]
- Dakubo, G.D. *Cancer Biomarkers in Body Fluids: Principles*; Springer: Berlin, Germany, 2016; pp. 1–299.
- Kaldjian, E.P.; Ramirez, A.B.; Sun, Y.; Campton, D.E.; Werbin, J.L.; Varshavskaya, P.; Quarre, S.; George, T.; Madan, A.; Blau, C.A.; et al. The RareCyt@platform for next-generation analysis of circulating tumor cells. *Cytom. Part A* **2018**, *93*, 1220–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ruiz-Rodríguez, A.J.; Molina-Vallejo, M.P.; Aznar-Peralta, I.; González Puga, C.; Cañas García, I.; González, E.; Lorente, J.A.; Serrano, M.J.; Garrido-Navas, M.C. Deep Phenotypic Characterisation of CTCs by Combination of Microfluidic Isolation (IsoFlux) and Imaging Flow Cytometry (ImageStream). *Cancers* **2021**, *13*, 6386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mohamed Suhaimi, N.-A.; Foong, Y.M.; Lee, D.Y.S.; Phyo, W.M.; Cima, I.; Lee, E.X.W.; Goh, W.L.; Lim, W.Y.; Chia, K.S.; Kong, S.L.; et al. Non-invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. *Mol. Oncol.* **2015**, *9*, 850–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alva, A.; Friedlander, T.; Clark, M.; Huebner, T.; Daignault, S.; Hussain, M.; Lee, C.; Hafez, K.; Hollenbeck, B.; Weizer, A.; et al. Circulating Tumor Cells as Potential Biomarkers in Bladder Cancer. *J. Urol.* **2015**, *194*, 790–798. [[CrossRef](#)]

17. Ma, Y.; Luk, A.; Young, F.P.; Lynch, D.; Chua, W.; Balakrishnar, B.; De Souza, P.; Becker, T.M. Droplet Digital PCR Based Androgen Receptor Variant 7 (AR-V7) Detection from Prostate Cancer Patient Blood Biopsies. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rao, Q.; Zhang, Q.; Zheng, C.; Dai, W.; Zhang, B.; Ionescu-Zanetti, C.; Lin, Z.; Zhang, L. Detection of circulating tumour cells in patients with epithelial ovarian cancer by a microfluidic system. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2017**, *10*, 9599–9606.
19. Sánchez-Lorencio, M.I.; Ramirez, P.; Saenz, L.; Martínez Sánchez, M.V.; De La Orden, V.; Mediero-Valeros, B.; Veganzones-De-Castro, S.; Baroja-Mazo, A.; Nuin, B.R.; Gonzalez, M.R.; et al. Comparison of Two Types of Liquid Biopsies in Patients with Hepatocellular Carcinoma Awaiting Orthotopic Liver Transplantation. *Transplant. Proc.* **2015**, *47*, 2639–2642. [[CrossRef](#)]
20. Ramirez, P.; Sáenz, L.; Cascales-Campos, P.A.; González Sánchez, M.R.; Llàcer-Millán, E.; Sánchez-Lorencio, M.I.; Díaz-Rubio, E.; De La Orden, V.; Mediero-Valeros, B.; Navarro, J.L.; et al. Oncological Evaluation by Positron-emission Tomography, Circulating Tumor Cells and Alpha Fetoprotein in Patients with Hepatocellular Carcinoma on the Waiting List for Liver Transplantation. *Transplant. Proc.* **2016**, *48*, 2962–2965. [[CrossRef](#)]
21. Vilhav, C.; Engström, C.; Naredi, P.; Novotny, A.; Bourghardt-Fagman, J.; Iresjö, B.-M.; Asting, A.G.; Lundholm, K. Fractional uptake of circulating tumor cells into liver-lung compartments during curative resection of periampullary cancer. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 6331–6338. [[CrossRef](#)]
22. Amado, V.; González-Rubio, S.; Zamora, J.; Alejandre, R.; Espejo-Cruz, M.L.; Linares, C.; Sánchez-Frías, M.; García-Jurado, G.; Montero, J.L.; Ciria, R.; et al. Clearance of Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma Undergoing Surgical Resection or Liver Transplantation. *Cancers* **2021**, *13*, 2476. [[CrossRef](#)]
23. Wu, J.; Raba, K.; Guglielmi, R.; Behrens, B.; Van Dalum, G.; Flügen, G.; Koch, A.; Patel, S.; Knoefel, W.T.; Stoecklein, N.H.; et al. Magnetic-Based Enrichment of Rare Cells from High Concentrated Blood Samples. *Cancers* **2020**, *12*, 933. [[CrossRef](#)]
24. Alvarez Cubero, M.J.; Lorente, J.A.; Robles-Fernandez, I.; Rodriguez-Martinez, A.; Puche, J.L.; Serrano, M.J. Circulating Tumor Cells: Markers and Methodologies for Enrichment and Detection. In *Circulating Tumor Cells; Methods in Molecular Biology*; Springer: Berlin, Germany, 2017; Volume 1634, pp. 283–303.
25. Hou, J.-M.; Krebs, M.G.; Lancashire, L.; Sloane, R.; Backen, A.; Swain, R.K.; Priest, L.J.; Greystoke, A.; Zhou, C.; Morris, K.; et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 525–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aceto, N.; Bardia, A.; Miyamoto, D.T.; Donaldson, M.C.; Wittner, B.S.; Spencer, J.A.; Yu, M.; Pely, A.; Engstrom, A.; Zhu, H.; et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **2014**, *158*, 1110–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fabisiwicz, A.; Grzybowska, E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med. Oncol.* **2017**, *34*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Venkatalakshmi, B.; Thilagavathi, K. Automatic red blood cell counting using hough transform. In Proceedings of the 2013 IEEE Conference on Information Communication Technologies, Thuckalay, India, 11–12 April 2013; pp. 267–271.
29. Bewes, J.M.; Suchowerska, N.; McKenzie, D.R. Automated cell colony counting and analysis using the circular Hough image transform algorithm (CHiTA). *Phys. Med. Biol.* **2008**, *53*, 5991–6008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bukowska, D.M.; Chew, A.L.; Huynh, E.; Kashani, I.; Wan, S.L.; Wan, P.M.; Chen, F.K. Semi-automated identification of cones in the human retina using circle Hough transform. *Biomed. Opt. Express* **2015**, *6*, 4676. [[CrossRef](#)]
31. Acharya, V.; Kumar, P. Identification and red blood cell automated counting from blood smear images using computer-aided system. *Med. Biol. Eng. Comput.* **2018**, *56*, 483–489. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, L.; Ye, Y.; Dhar, R.; Deng, J.; Tang, H. Estimating Dynamic Cellular Morphological Properties via the Combination of the RTCA System and a Hough-Transform-Based Algorithm. *Cells* **2019**, *8*, 1287. [[CrossRef](#)]
33. Matas, J.; Galambos, C.; Kittler, J. Robust Detection of Lines Using the Progressive Probabilistic Hough Transform. *Comput. Vis. Image Underst.* **2000**, *78*, 119–137. [[CrossRef](#)]
34. Xu, Z.; Shin, B.-S.; Klette, R. Closed form line-segment extraction using the Hough transform. *Pattern Recognit.* **2015**, *48*, 4012–4023. [[CrossRef](#)]
35. Smith, R.; Najarian, K.; Ward, K. A hierarchical method based on active shape models and directed Hough transform for segmentation of noisy biomedical images; application in segmentation of pelvic X-ray images. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* **2009**, *9*, S2. [[CrossRef](#)]
36. Parkinson, D.R.; Dracopoli, N.; Petty, B.G.; Compton, C.; Cristofanilli, M.; Deisseroth, A.; Hayes, D.F.; Kapke, G.; Kumar, P.; Lee, J.S.; et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hendricks, A.; Dall, K.; Brandt, B.; Geisen, R.; Röder, C.; Schafmayer, C.; Becker, T.; Hinz, S.; Sebens, S. Longitudinal Analysis of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer Patients by a Cytological and Molecular Approach: Feasibility and Clinical Application. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 646885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Vasseur, A.; Kiavue, N.; Bidard, F.-C.; Pierga, J.-Y.; Cabel, L. Clinical utility of circulating tumor cells: An update. *Mol. Oncol.* **2021**, *15*, 1647–1666. [[CrossRef](#)]
39. Riethdorf, S.; O’Flaherty, L.; Hille, C.; Pantel, K. Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *125*, 102–121. [[CrossRef](#)]
40. Cristofanilli, M. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *Semin. Oncol.* **2006**, *33* (Suppl. 9), 9–14. [[CrossRef](#)]

41. Nelep, C.; Eberhardt, J. Automated rare single cell picking with the ALS celllectorTM. *Cytom. Part A* **2018**, *93*, 1267–1270. [[CrossRef](#)]
42. Di Trapani, M.; Manaresi, N.; Medoro, G. DEPArrayTM system: An automatic image-based sorter for isolation of pure circulating tumor cells. *Cytom. Part A* **2018**, *93*, 1260–1266. [[CrossRef](#)]
43. Scholtens, T.M.; Schreuder, F.; Ligthart, S.T.; Swennenhuis, J.F.; Tibbe, A.G.J.; Greve, J.; Terstappen, L.W. CellTracks TDI: An image cytometer for cell characterization. *Cytom. Part A* **2011**, *79*, 203–213. [[CrossRef](#)]
44. Agerbæk, M.Ø.; Bang-Christensen, S.R.; Yang, M.-H.; Clausen, T.M.; Pereira, M.A.; Sharma, S.; Ditlev, S.B.; Nielsen, M.A.; Choudhary, S.; Gustavsson, T.; et al. The VAR2CSA malaria protein efficiently retrieves circulating tumor cells in an EpCAM-independent manner. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3279. [[CrossRef](#)]
45. Padillo-Ruiz, J.; Suarez, G.; Pereira, S.; Calero-Castro, F.J.; Tinoco, J.; Marin, L.; Bernal, C.; Cepeda-Franco, C.; Alamo, J.M.; Almoguera, F.; et al. Circulating Tumor Cells Enumeration from the Portal Vein for Risk Stratification in Early Pancreatic Cancer Patients. *Cancers* **2021**, *13*, 6153. [[CrossRef](#)]
46. Cao, J.; Chen, L.; Wang, M.; Tian, Y. Implementing a Parallel Image Edge Detection Algorithm Based on the Otsu-Canny Operator on the Hadoop Platform. *Comput. Intell. Neurosci.* **2018**, *2018*, 3598284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Al-Kofahi, Y.; Lassoued, W.; Lee, W.; Roysam, B. Improved automatic detection and segmentation of cell nuclei in histopathology images. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2010**, *57*, 841–852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Nnolim, U.A. Automated crack segmentation via saturation channel thresholding, area classification and fusion of modified level set segmentation with Canny edge detection. *Heliyon* **2020**, *6*, e05748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Barriere, G.; Fici, P.; Gallerani, G.; Fabbri, F.; Zoli, W.; Rigaud, M. Circulating tumor cells and epithelial, mesenchymal and stemness markers: Characterization of cell subpopulations. *Ann. Transl. Med.* **2014**, *2*, 109.
50. Chen, J.; Wang, H.; Zhou, L.; Liu, Z.; Tan, X. A combination of circulating tumor cells and CA199 improves the diagnosis of pancreatic cancer. *J. Clin. Lab. Anal.* **2022**, *36*, e24341. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.