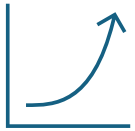




Estudio Molecular en Neoplasias Quísticas del Páncreas

Dr. Pablo Zoroquiain PhD
Profesor Asociado
Pontificia Universidad Católica de Chile.

Introducción



Integración clínica, imagenológica y citológica

Quiste Pancreático



Descartar pseudoquiste

Elementos clínicos y radiológicos definitorios RM y/o TC

Si

No

INDETERMINADO

EUS-FNA

Considerar EUS - FNA al diagnóstico en:
NQP indeterminada en EUS > 15 mm y
NQP con características preocupantes
(Worrisome features)

- Pancreatitis atribuible a NQP
- DM2 de reciente comienzo
- Ca 19-9 sérico elevado >37 U/ml
- NQP mayor o igual a 3 cm
- Crecimiento mayor a 2.5 mm/año
- Nódulo mural captante menor a 5 mm
- Engrosamiento de la pared del quiste
- Conducto pancreático principal entre 5 y 9 mm
- Cambio abrupto del calibre del conducto pancreático principal con atrofia distal del páncreas
- Presencia de adenopatías locales

Seroso
(SCA)

Sintomático

IPMN-RP
MCN
SPN

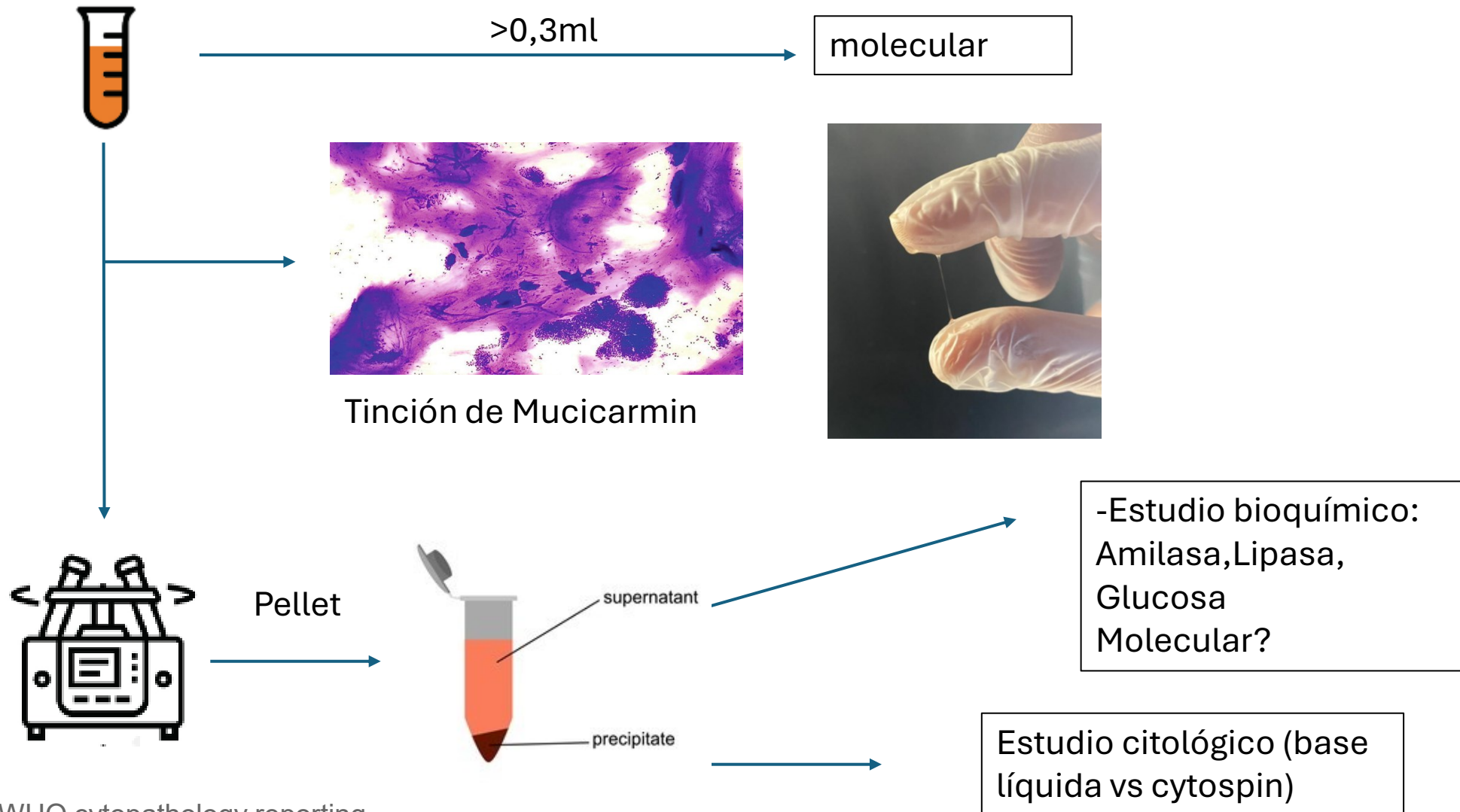
Lesión indeterminada
IPMN-RS

Observación

Evaluación de Cirugía

Seguimiento

Manejo de la muestra



Diagnostic category	Estimated ROM^a	Clinical management options^b	Cysts
Insufficient/Inadequate/Non-diagnostic	5–25%	Repeat FNAB	
Benign / Negative for malignancy	0–15%	Correlate clinically	Pseudo, serous
Atypical	30–40%	Repeat FNAB	
Pancreaticobiliary neoplasm, low-risk/grade (PaN-low)	5–20%	Correlate clinically	IPMN, IOPN, MCN
Pancreaticobiliary neoplasm, high-risk/grade (PaN-high)	60–95%	Surgical resection in surgically fit patients; conservative management optional	IPMN, MCN
Suspicious for malignancy	80–100%	If patient to be surgically managed, treat as positive; if patient requires preoperative therapy, repeat FNAB	
Malignant	99–100%	Per clinical stage	Adeno, SSPN, NET

Categorización

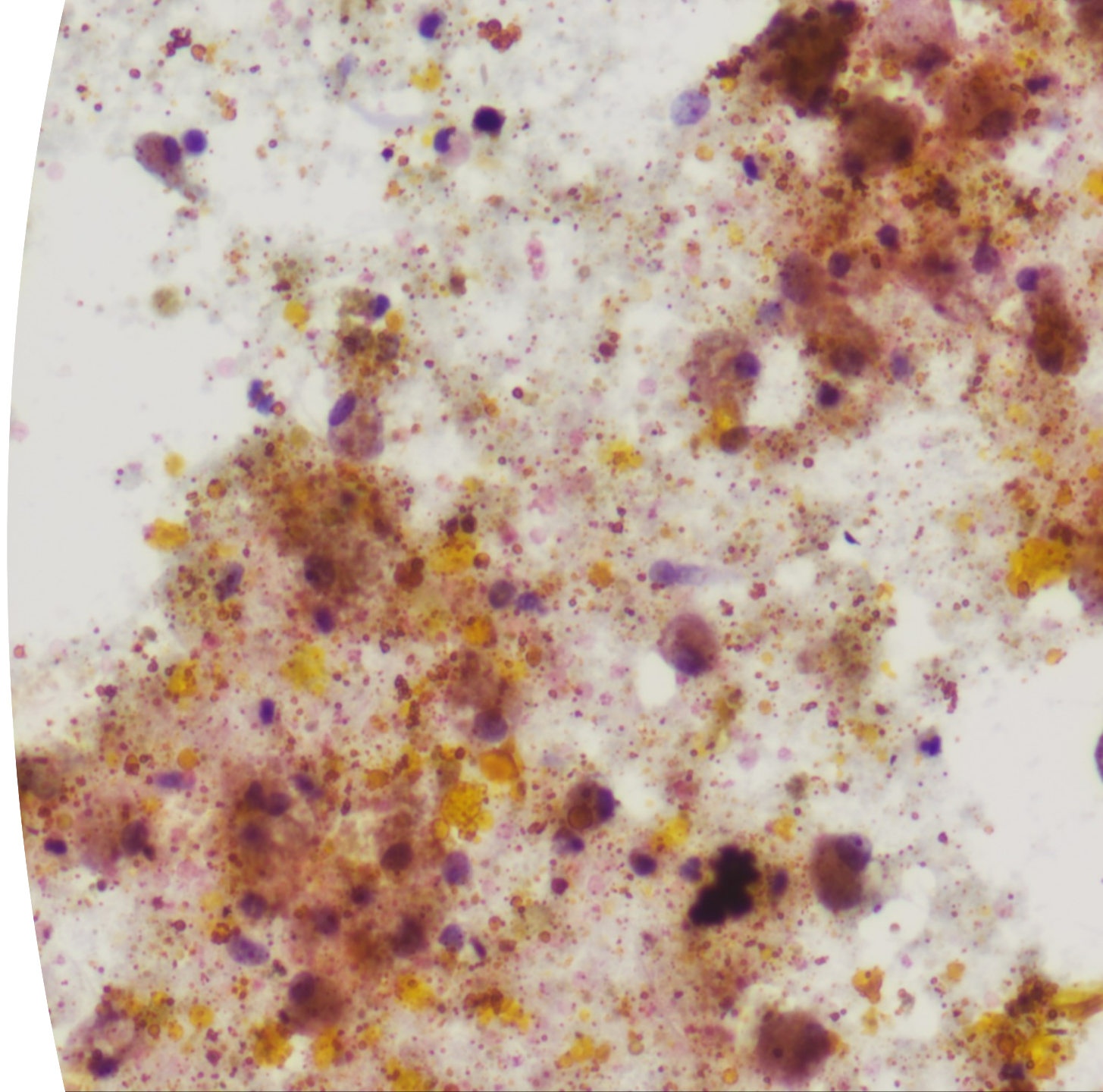
- Benignos:
 - quistes retentivos y pseudoquistes
 - Cistoadenoma seroso
- Neoplasias pancreatobiliares (quistes mucinosos):
 - IPMN vs NMQ vs con componente adenocarcinoma
- Neoplasias malignas:
 - Neoplasia sólida pseudopapilar
 - Tumor neuroendocrino quístico
- Otros (linfoepitelial, escamoso, transformación quística acinar...)

Categorización

- Benignos:
 - quistes retentivos y pseudoquistes
 - Cistoadenoma seroso

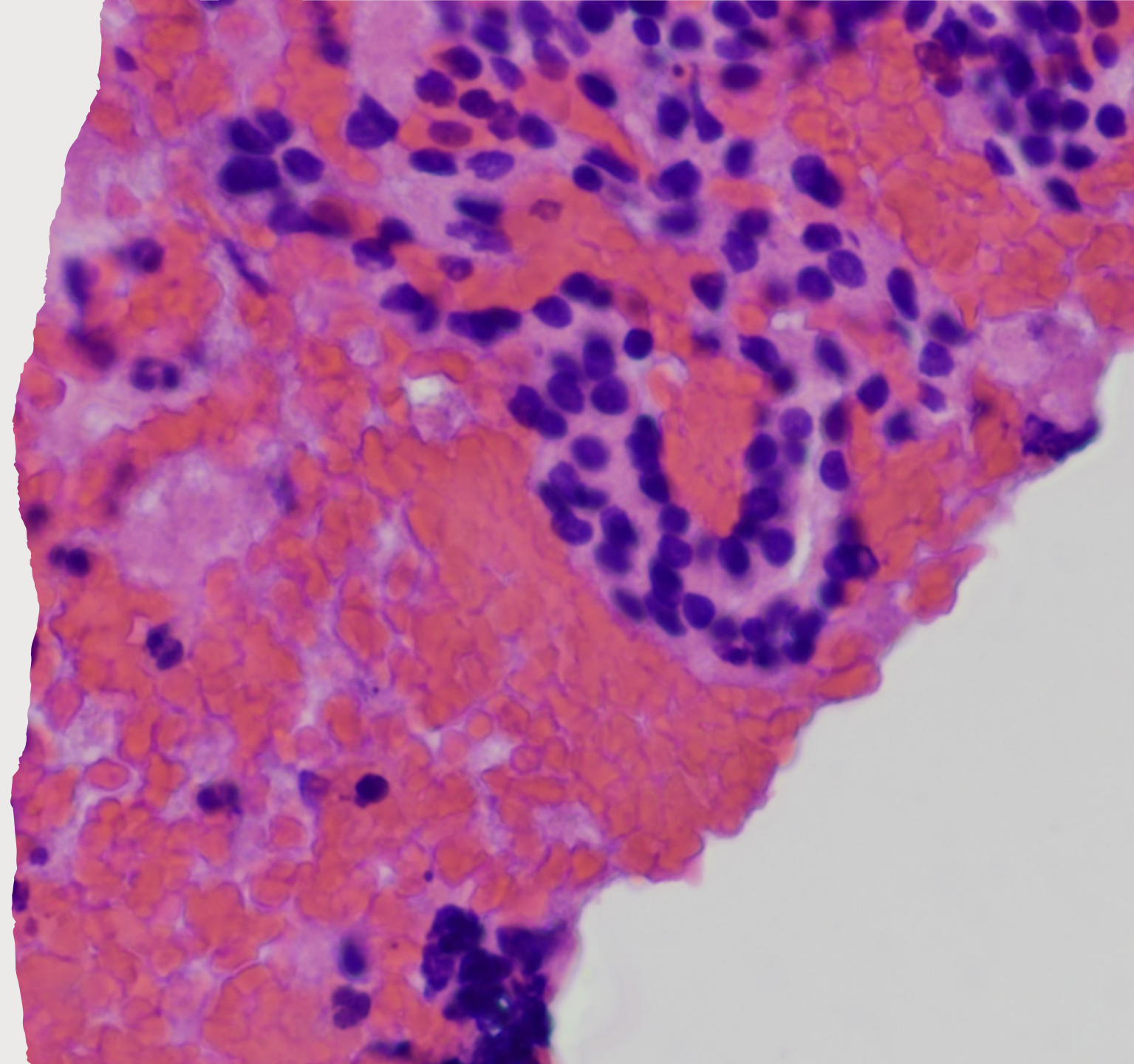
Pseudoquistes

- Espacios llenos de fluido sin revestimiento epitelial
- Citología:
 - Fondo proteináceo con necrosis.
 - Linfocitos e histiocitos.
 - Pigmento de tipo hematoidina.
- Bioquímico:
 - Amilasa >1000ng/ml y CEA<192ng/ml



Cistoadenoma seroso

- M:H = 4:1
- Lesión multiquística (variante sólida y macroquística)
- Citología: Células cubiodales, pequeñas y uniformes.
- IHQ positivo para CK, GLUT1 e inhibina.
- Bioquímicos:
 - CEA < 192
 - Amilasa < 250



Estudios moleculares

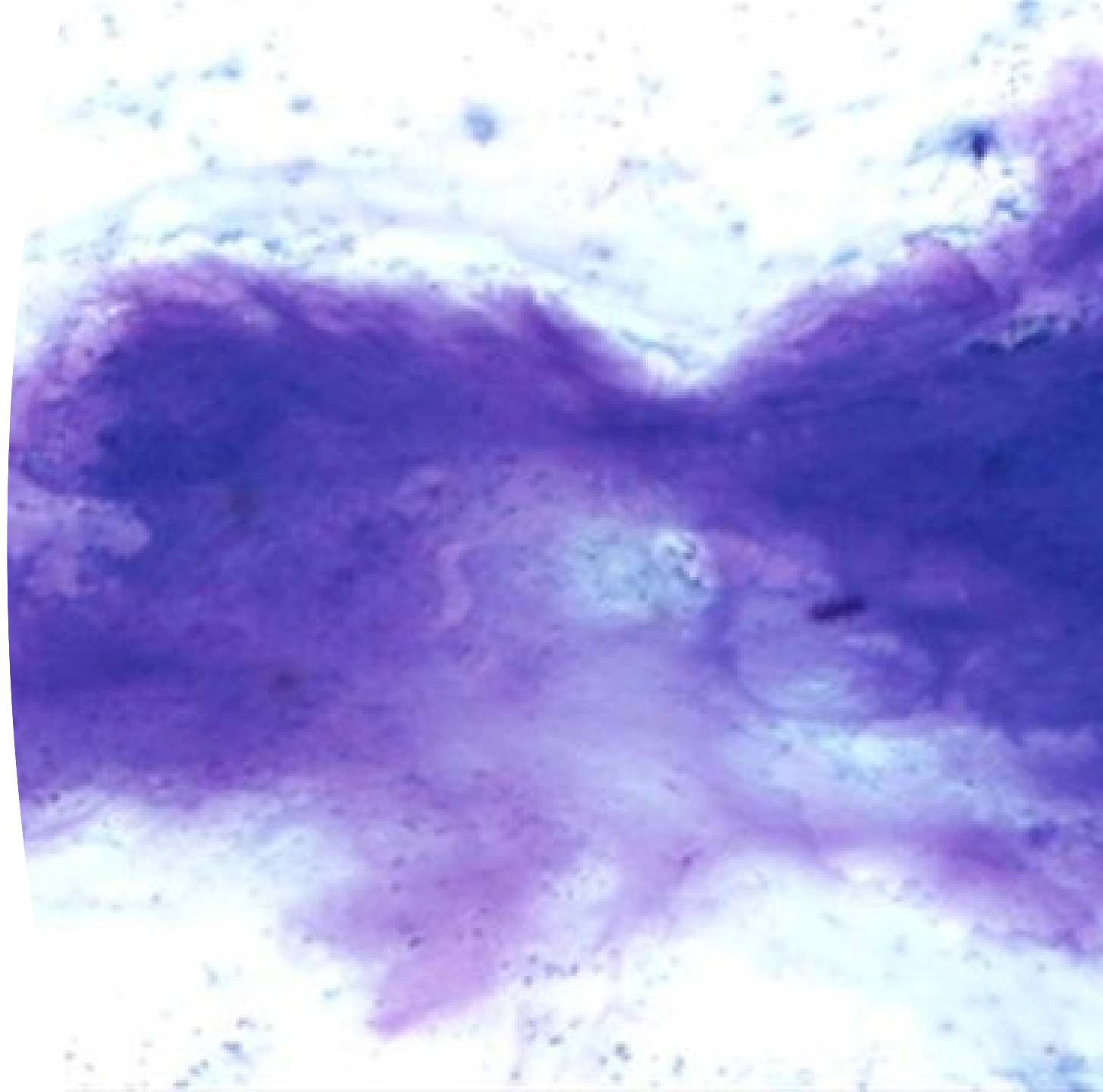
- Mutación VHL: somática vs germinal (múltiples quistes)
- KRAS, GNAS, CDKN2A, and SMAD4: wild type.
- TP53 y promotor TERT: crecimiento acelerado

Categorización

- Benignos:
 - quistes retentivos y pseudoquistes
 - Cistoadenoma seroso
- Neoplasias pancreatobiliares (quistes mucinosos):
 - IPMN vs NMQ vs con componente adenocarcinoma

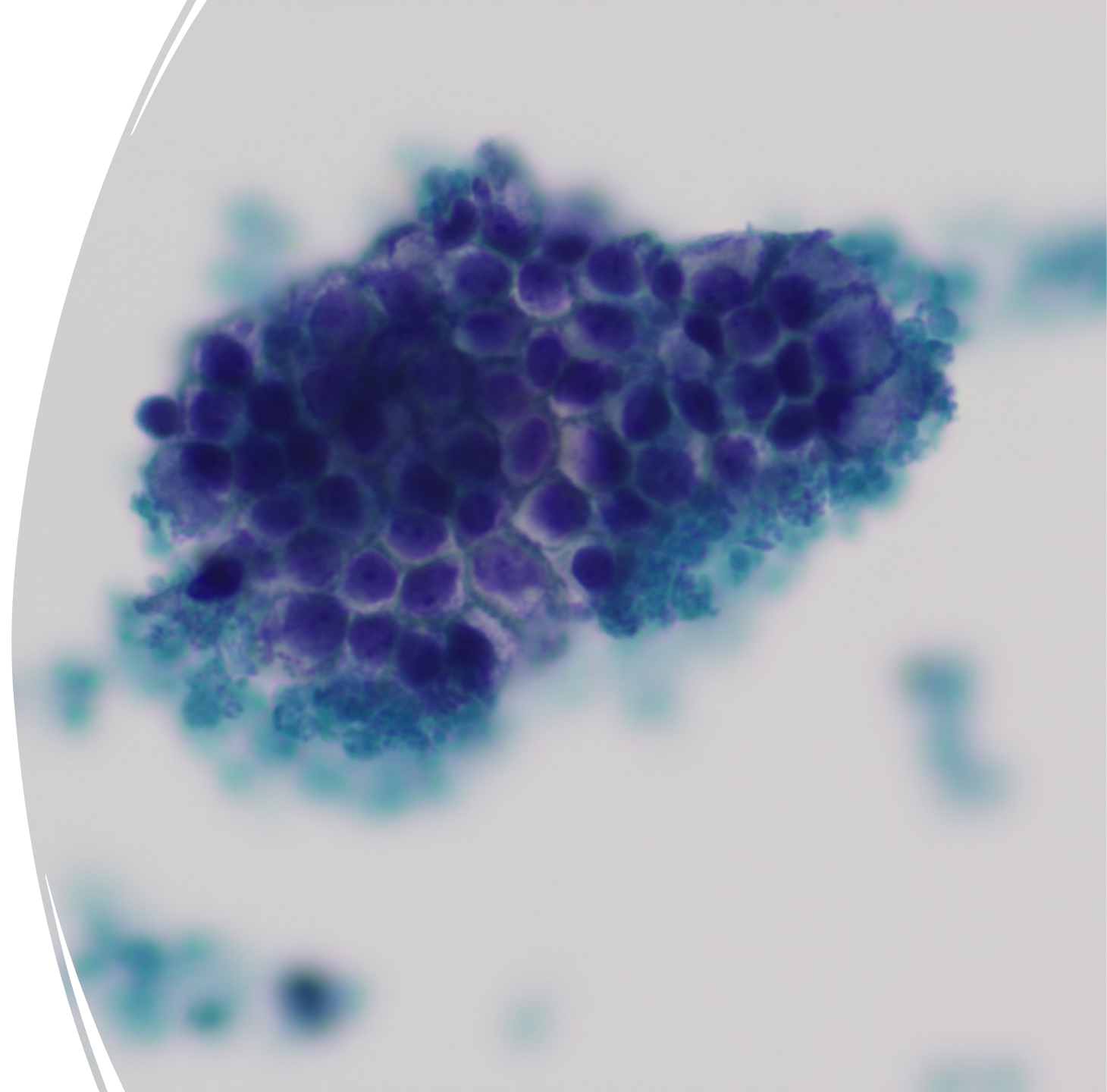
Quistes mucinosos (IPMN/NMQ)

- Mucina gruesa.



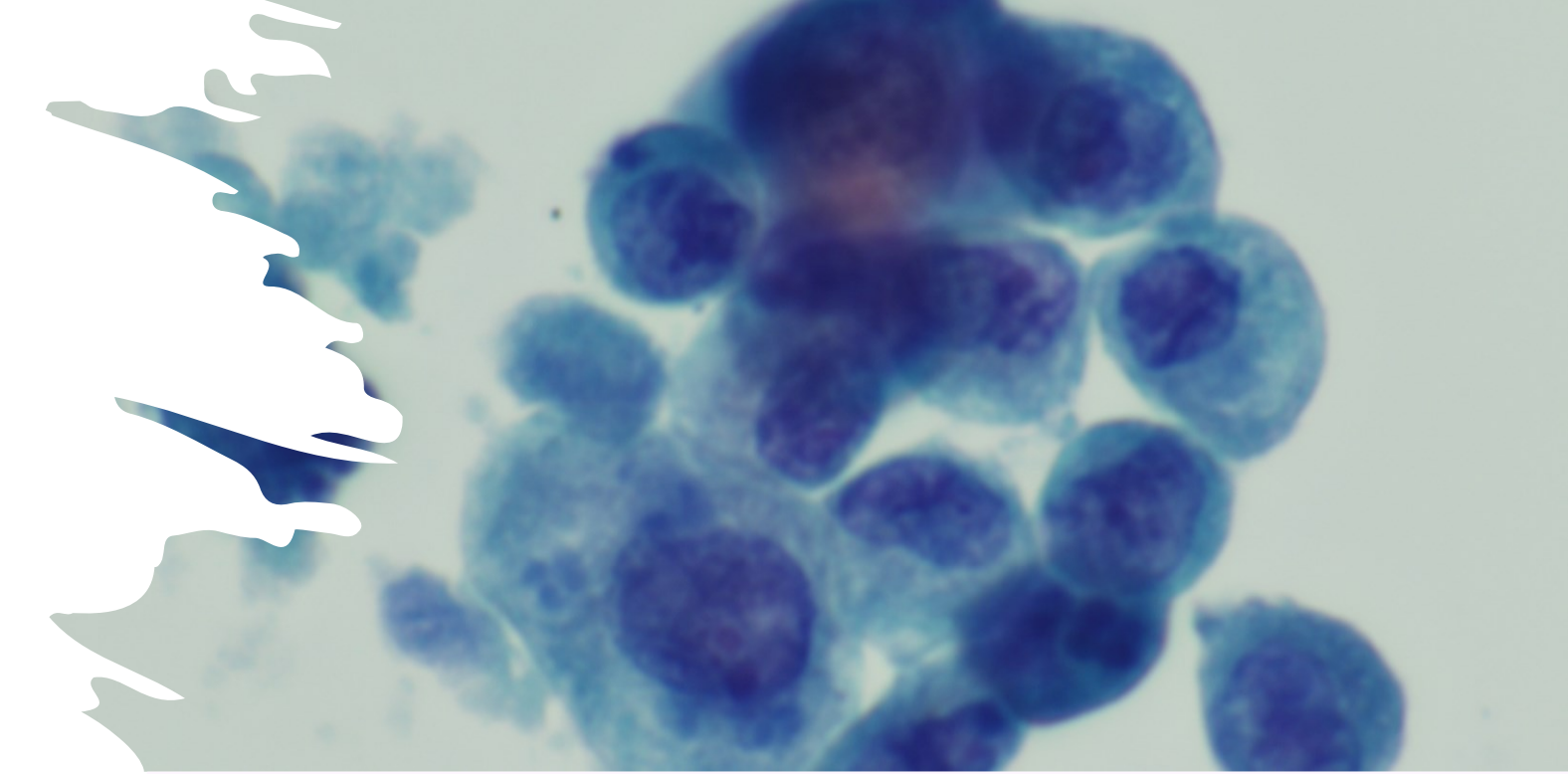
Quiestes mucinosos (IPMN/NMQ)

- Mucina gruesa.
- Bajo grado: Núcleos polarizados, atipia nuclear leve. Sin necrosis.



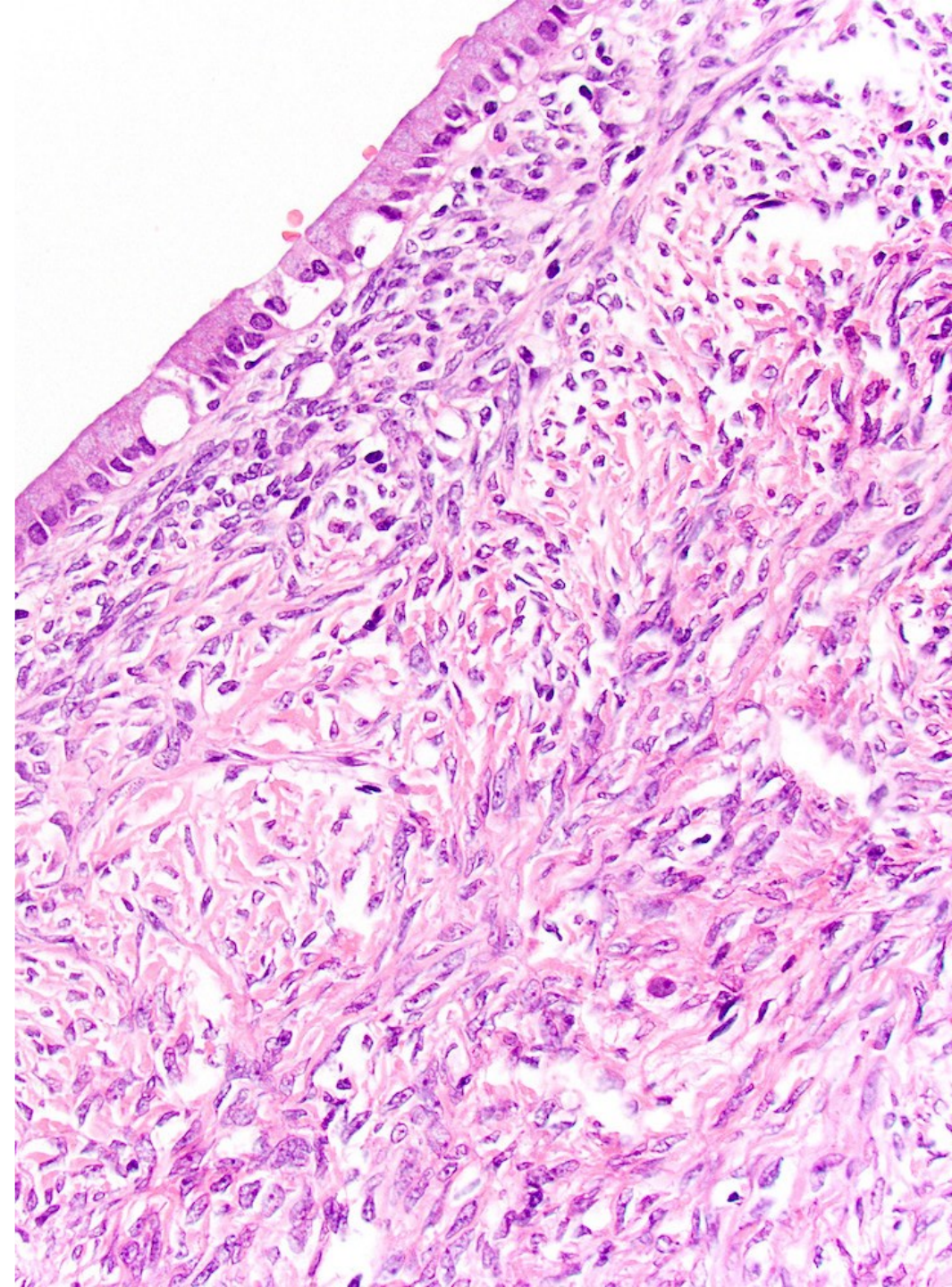
Quiestes mucinosos (IPMN/NMQ)

- Mucina gruesa.
- Bajo grado: Núcleos polarizados, atipia nuclear leve. Sin necrosis.
- Alto grado: Núcleos con alta relación N/C, atipia nuclear acentuada.



Quistes mucinosos (IPMN/NMQ)

- Mucina gruesa.
- Bajo grado: Núcleos polarizados, atipia nuclear leve. Sin necrosis.
- Alto grado: Núcleos con alta relación N/C, atipia nuclear acentuada.
- IPMN vs NMQ
 - Localización (cabeza vs cuerpo y cola).
 - Relación con conducto.
 - Estroma (pinza especial?).



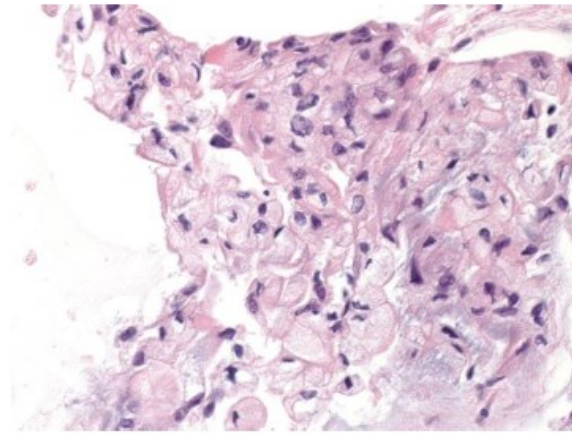
Análisis bioquímicos

- HGT < 50 (S90% y E82%)
- CEA > 192 ng/ml (S67% y E80%)
- Amilasa < 250 UI/L

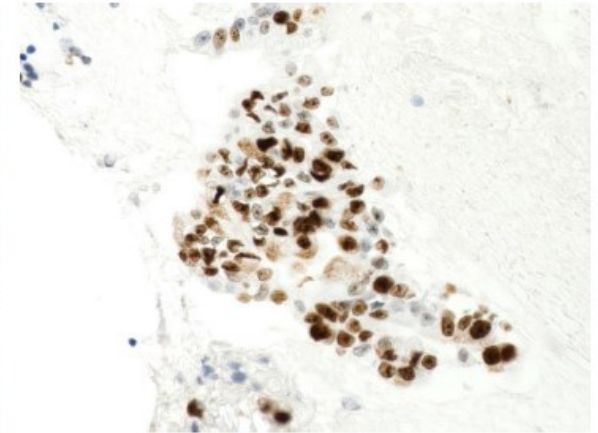
Quistes linfocelulares
Contaminación con sangre
Elevación en procesos
inflamatorios

Inmunohistoquímica:

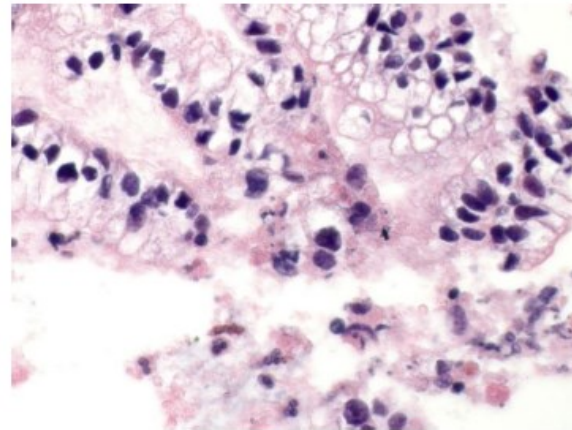
- Requiere de una buena muestra en un block.
 - P53
 - SMAD4



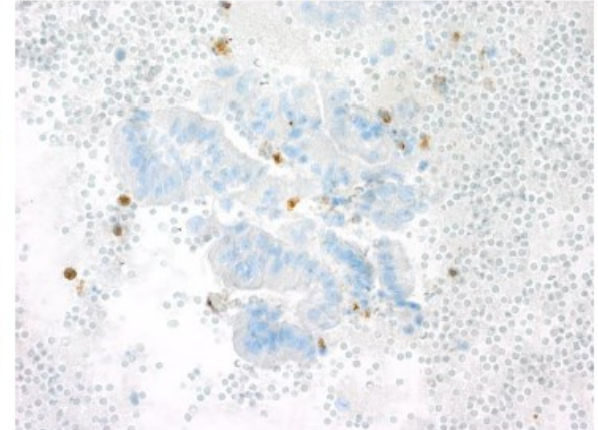
(a)



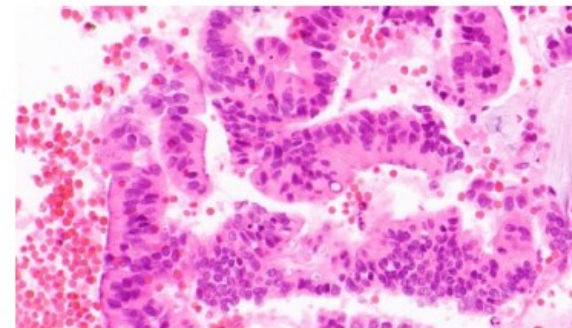
(b)



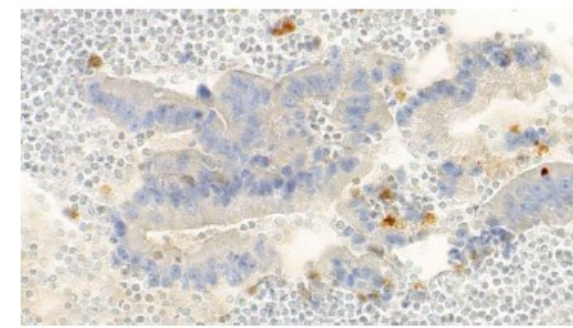
(c)



(d)



(a)



(b)

Estudios moleculares

- *KRAS*: IPMN y NMQ
 - No asociado al grado
- *GNAS*: IPMN intestinal y < NMQ
- *KLF4* >50% de bajo grado y <15% de alto grado
- *RNF43* y *CDKN2A* : + lesiones de alto grado no invasivas.
- *TP53*, *SMAD4* y *TGFBR2*: + en lesiones invasivas.
- *KRAS+GNAS* (S94 y E91)
 - No reconoce grado.

Perez R et al. Molecular analysis of pancreatic cystic neoplasm in routine clinical Practice. WJGE 2021

Xia, Rong et al . The utility of molecular studies on pancreatic cystic lesions: A comprehensive review. Human Pathology Reports. 2024

Estudio de metilación

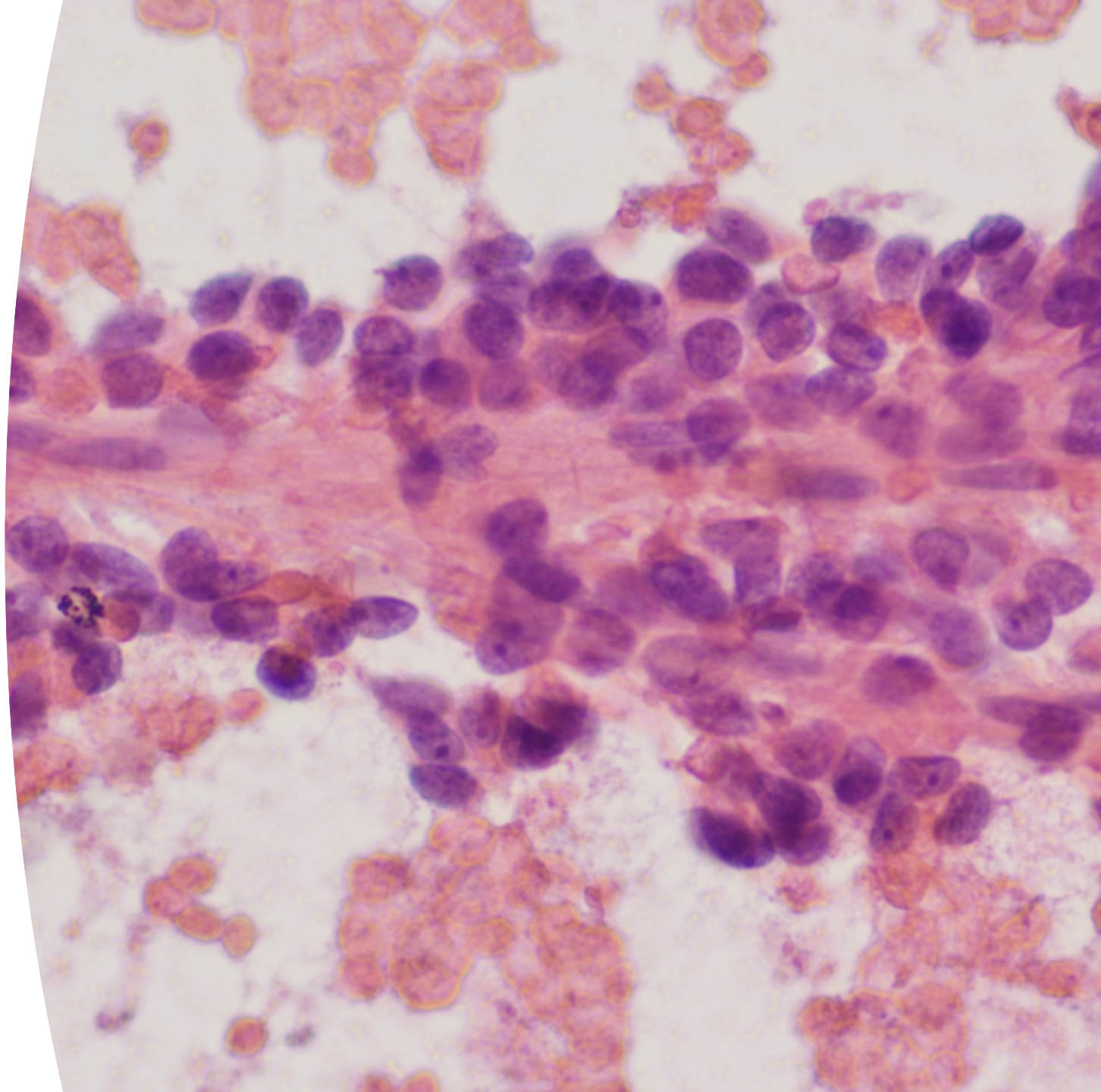
- CDKN2A: IPMN
- APC, CDH1, MLH1y MGMT: Adenocarcinoma ductal

Categorización

- Benignos:
 - quistes retentivos y pseudoquistes
 - Cistoadenoma seroso
- Neoplasias pancreatobiliares (quistes mucinosos):
 - IPMN vs NMQ vs con componente adenocarcinoma
- Neoplasias malignas:
 - Neoplasia sólida pseudopapilar
 - Tumor neuroendocrino quístico
- Otros (linfoepitelial, escamoso, transformación quística acinar...)

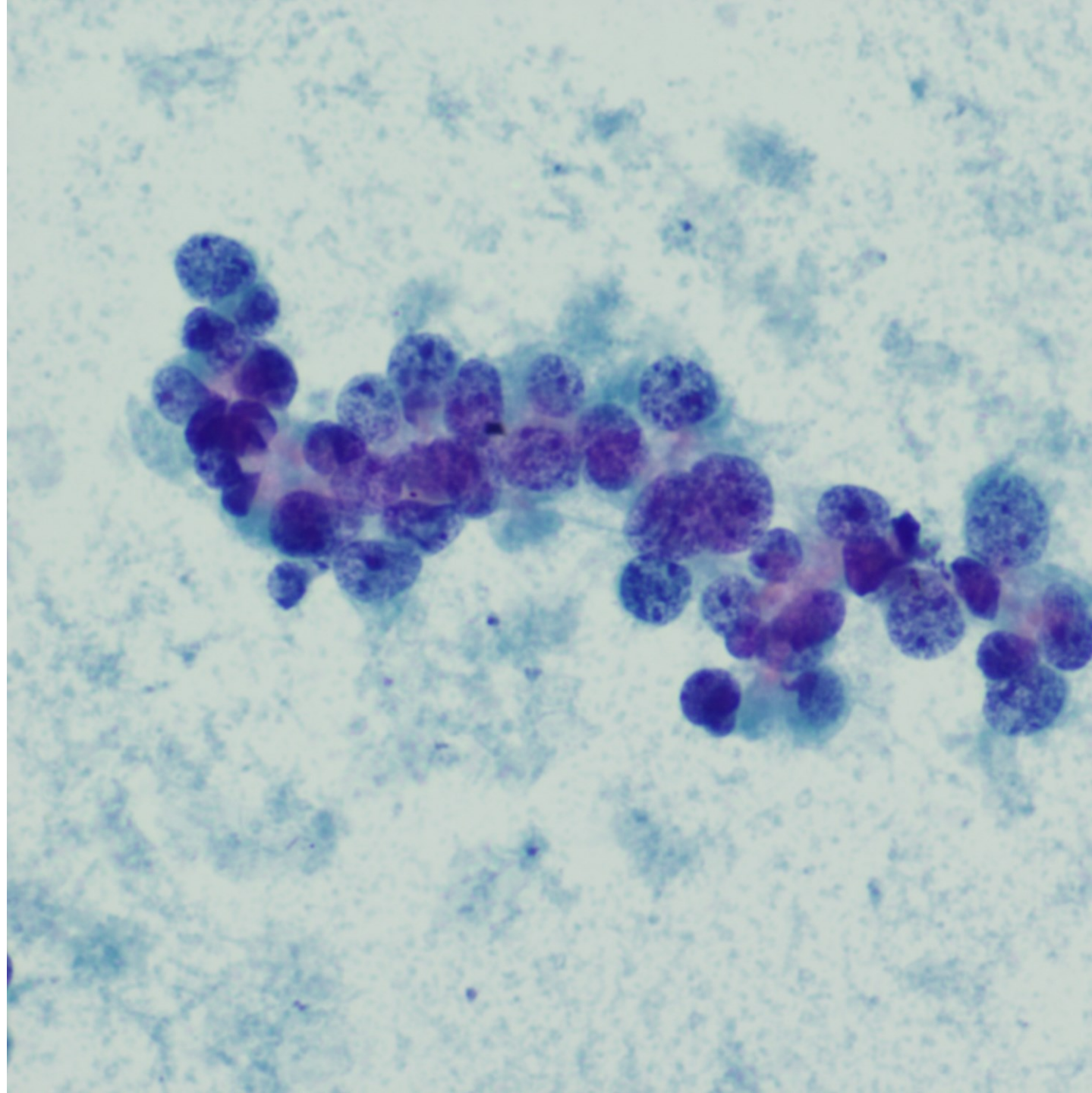
Neoplasia sólida pseudopapilar

- Tumor maligno de bajo grado
- Sin diferenciación específica
- Habitualmente con degeneración quística
- Alteración molecular:
 - mutación CTNNB1, que puede ser visualizada con IHQ.
 - KRAS, TP53 y SMAD4 wild type.



Tumor neuroendocrino quístico

- Bien diferenciados vs poco diferenciados
- Bien diferenciados: G1-G3. NE +Ki67.
- Biología molecular:
 - MEN1 mut y LOH
 - Met promotor VHL
 - Mut PIK3CA, PTEN y TSC2
 - LOH>3 se asocia a mets.



Pancreatic Cystic Lesions	Molecular Alterations	
	Most Common	Enriched in Advanced Neoplasia */Progression
	Mucinous Neoplastic Cysts	
Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)	<i>KRAS, GNAS, KLF4, RNF43,</i> (rare <i>BRAF, EGFR, HER2</i>)	<i>TP53, SMAD4, mTOR</i> genes **
Mucinous cystic neoplasm (MCN)	<i>KRAS, RNF43</i>	<i>TP53, SMAD4, mTOR</i> genes **
Intraductal oncocytic papillary neoplasm (IOPN)	Rearrangements in <i>PRKACA</i> and <i>PRKACB</i> ; Mutations in <i>ARHGAP26, ASXL1, EPHA8,</i> <i>ERBB4</i>	
Intraductal tubulopapillary neoplasm (ITPN) ***	Chromatin remodeling genes (<i>MLL1, MLL2,</i> <i>MLL3, BAP1</i>); PI3K pathway genes (<i>PIK3CA,</i> <i>PTEN</i>)	
	Non-Mucinous Neoplastic Cysts	
Serous cystadenoma	<i>VHL</i>	<i>TP53, TERT</i> promoter mutations
Solid pseudopapillary neoplasm	<i>CTNNB1</i>	
Cystic neuroendocrine tumor	<i>MEN1</i> <i>VHL</i>	Loss of <i>ATRX/DAXX</i> ; Alternative lengthening of telomeres; Loss of heterozygosity ≥ 3 genes



FACULTAD DE MEDICINA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CHILE



Red de Salud
UC • CHRISTUS 

Lanzamiento del Programa de Biopsia Líquida

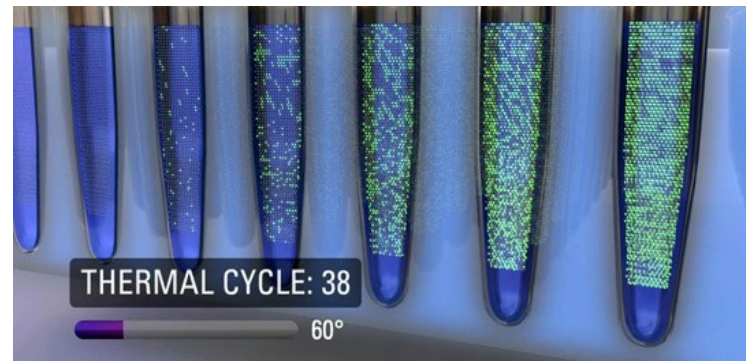
04 de Agosto de 2017 | Auditorio del Hospital Clínico Red de Salud UC CHRISTUS

VIERNES 04 DE AGOSTO 2017

Next-generation sequencer NextSeq 550Dx



Plataforma de PCR Digital Auto DG QX200



Sensibilidad de =0,0001
Ofrece Cuantificación Total
sin necesidad de genes de
referencia



Santiago, 12-07-2017

Número de Biopsia: **690006**

Número de OA: -

Paciente

RUT

Edad : 52 años 0 meses

Dr. : GALINDO

Muestra : BIOPSIA LÍQUIDA (SANGRE).

Antecedentes : Ca pulmonar en tratamiento.

Procedencia: EGFR - ROCHE

Ficha: Cama:

Fecha recepción muestra : 12-07-2017

Fecha emisión informe : 13-07-2017

Para estudio de EGFR, se recibe un tubo de sangre.

EXAMEN DE BIOLOGÍA MOLECULAR EGFR.

Se realiza disección de células tumorales para enriquecimiento de subpoblaciones celulares, luego de lo cual se realiza detección de mutaciones en exones 18, 20 y 21 y deleciones del exón 19, del dominio de tirosina quinasa del gen del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) (ver listado adjunto). El protocolo se realiza utilizando PCR en tiempo real utilizando el kit cobas® EGFR Mutation Test (ROCHE). Cada serie incluye un control de mutación y un control negativo para confirmar la validez.

RESULTADO:

SE DETECTA MUTACIÓN L858R DEL EXÓN 21 Y MUTACIÓN DE RESISTENCIA T790M DEL EXÓN 20.

NOTA:

LA INTERPRETACIÓN CLÍNICA ES QUE EL PACIENTE POSEE UNA MUTACIÓN DE RESISTENCIA A TERAPIAS DE INHIBICIÓN DEL EGFR.

La prueba se ha diseñado para detectar las siguientes mutaciones:

Exón 18: G719X (G719A, G719C y G719S)

Exón 19: deleciones y mutaciones complejas (E746_A750del, E746_A750del, L747_P753>S, L747_T751del, L747_S752del, L747_T751>P, E746_T751>A, E746_S752>V, E747_A750>P, L747_T751del, L747_E749del, E746_T751>I, E746_T751del, E746_S752>A, E746_S752>D, L747_A750>P, L747_T751>Q, L747_P753>Q, L747_T751>S, K745_E749del, S752_I759del, E746_A750>IP, E746_T751>V, E746_T751>IP, E746_S752>I, E746_T751>VA, E746_P753>VS, L747_T751del, L747_S752>Q y L747S).

Exón 20: S768I, T790M e inserciones (H773_V774insH, D770_N771insG, V769_D770insASV, V769_D770insASV, D770_N771insSVD).

Exón 21: L858R

JCR/RG

Report summary: Pancreatic ductal adenocarcinoma

5 Clinically significant biomarkers
3 Other biomarkers
1 Combination

0 Relevant therapies
2 Resistive therapies

1 Clinical trial

Variants & other biomarkers	Therapies approved/recommended in current diagnosis	Therapies approved/recommended in other indications
I-B present in combination CDKN2A deletion	none	See variant details for possible therapy options.
I-B variant SMAD4 p.W302fs	none	See variant details for possible therapy options.
I-C combination MSS, TMB Low	none	none
I-C present in combination CDKN2B deletion	none	none
I-C present in combination MTAP deletion	none	none
I-C present in combination KRAS p.G12D	none	cetuximab[†], panitumumab[†]
I-B present in combination TMB Low	none	See variant details for possible therapy options.
I-C present in combination MSS	none	none
other biomarker Genomic LOH Undetermined	none	none

* Therapy with altered response, † Therapy with resistance

Acuerdo exclusivo con Foundation One

324 (DNA)



324 genes (DNA)*

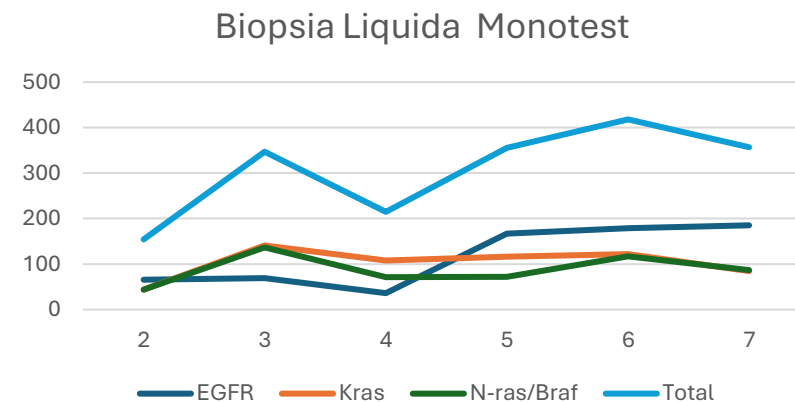


406 genes (DNA), 265 genes (RNA)

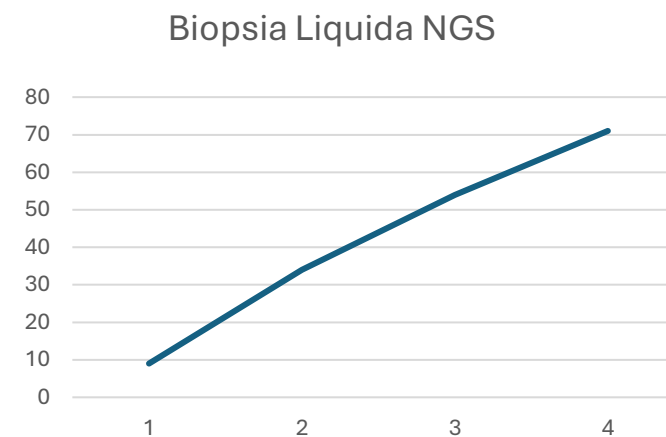


Biopsia Liquida Departamento Patología PUC

Biopsia Liquida /monotest	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
EGFR	44	66	69	36	167	179	185
Kras	0	44	141	108	116	122	85
Nras/Braf	0	44	137	71	72	117	87
Total	44	154	347	215	355	418	357



Biopsia Liquida NGS	2020	2021	2022	2023
Tejido	6	16	36	18
Liquida	2	12	12	9
Heme	1	4	6	4
Block	0	2	0	1
Total	9	34	54	32



Conclusión



Análisis de líquido obtenido de quistes pancreáticos requiere de correlación morfológica, bioquímica y molecular.



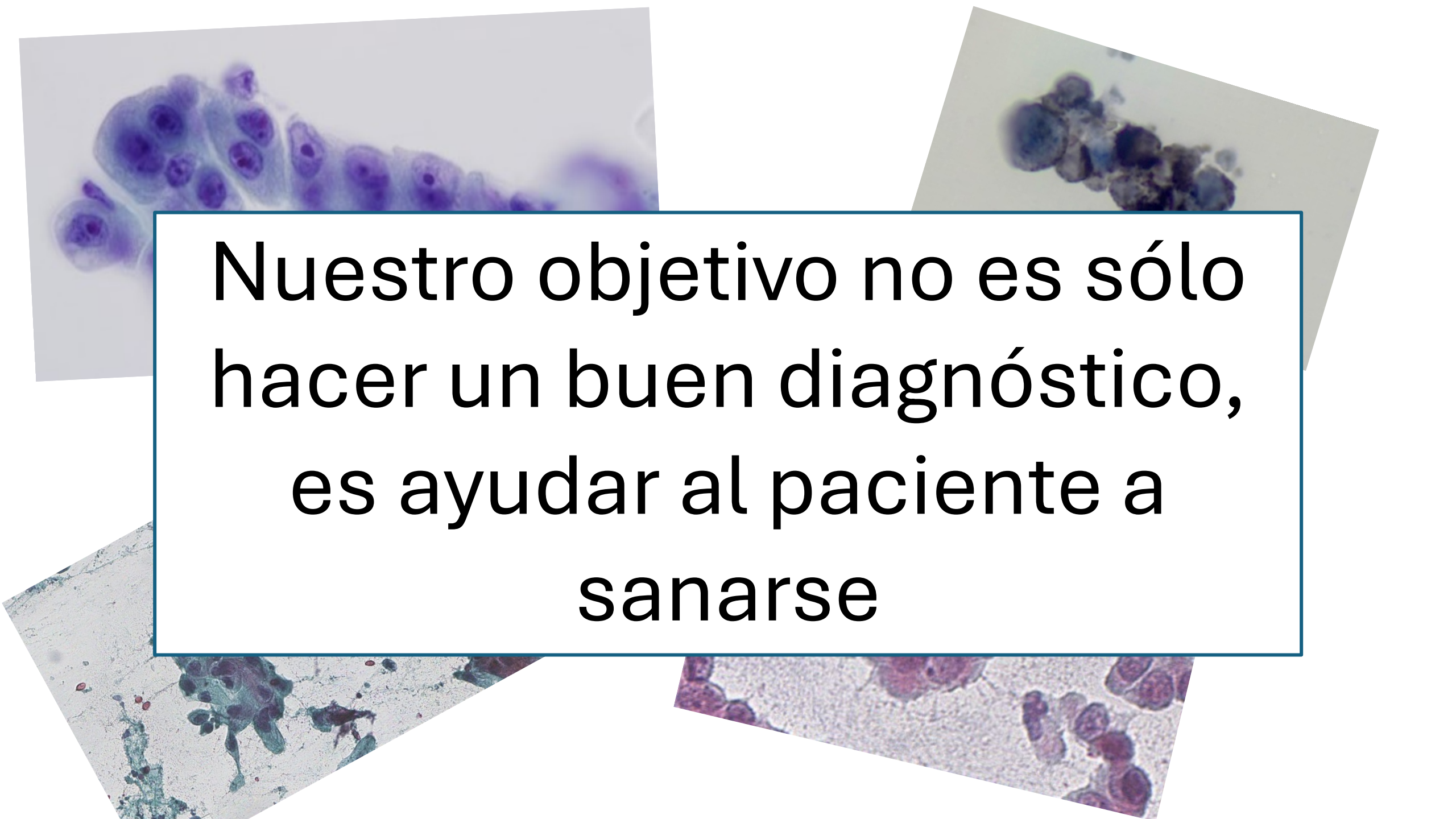
Se debe contar con un flujo de muestras que permita obtener éstas.



La utilización de biopsia líquida ha ido en aumento.



Las dificultades económicas son en estos momentos una gran limitante para el estudio multigénico en nuestro país.

The background of the slide features four microscopic images of cells, likely from a Pap smear. The top-left image shows a row of cells with large, dark purple nuclei. The top-right image shows a cluster of cells with similar dark purple nuclei. The bottom-left image shows a cell with a large, dark purple nucleus and a light blue cytoplasm. The bottom-right image shows a cell with a large, dark purple nucleus and a light purple cytoplasm. The central text is enclosed in a white box with a dark blue border.

Nuestro objetivo no es sólo
hacer un buen diagnóstico,
es ayudar al paciente a
sanarse

Agradecimientos

Gastroenterología:

Dr. José Ignacio Vargas
Dr. Hugo Richter
Dr. Ricardo Mejias
Dr. Alberto Espino

Biología Molecular:

TM. Jasmín Ibarra,
TM Valeria
Carreño
TM Elbia Zuñiga
Dr. Roger Gejman

Inmunohistoquímica

TM Romina Reyes
TM, Ricardo
Castro
Dr. José Valbuena

Residentes

Anatomía Patológica
Gastroenterología

Citología

TM Natalia Araya
TM Alejandro Gotlieb
TM Valentina Acuña
TENS Maria F. Sepúlveda
TENS Chantal Bustamante
TENS Mabel García
Sra. F. Yasmín Rubio
Sra. Edda Pérez

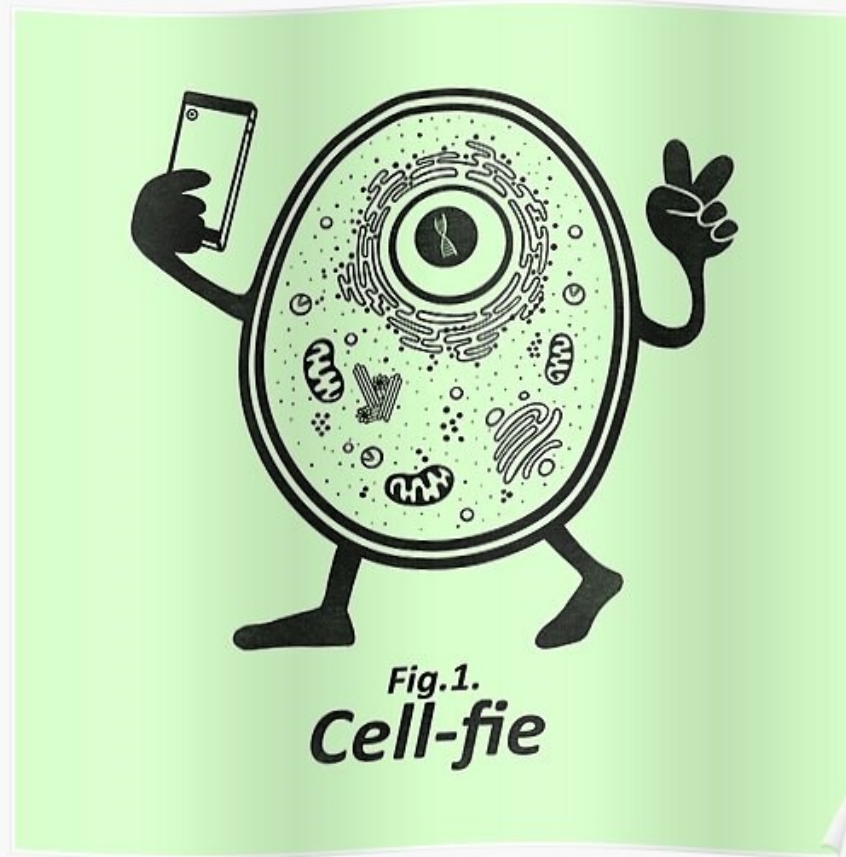


Fig.1.
Cell-fie

Muchas gracias.

Plataformas comerciales

Table 1

Summary of molecular assays on pancreatic cystic fluid specimens.

	PancreaSeq® GC	PancraGen® and PanDNA®
Methodology	Next Generation Sequencing	Sanger Sequencing
Test Report	Prediction of cyst type and risk of high-grade dysplasia / cancer and detailed results on all detected molecular alteration and <i>CEACAM5</i> gene expression level	Risk scoring includes molecular findings, non-molecular results (CEA and Amylase), and clinical criteria
Genetic Tests	Detects 74 pancreas tumor-related genes including mutations (20 genes), CNA/LOH (19 genes and chromosomal regions), gene fusions (170 types), and GEAs (5 genes)	Detects Mutations (<i>KRAS</i> , <i>GNAS</i>) and LOH of tumor suppression genes (19 genes)
Specimen Requirement	0.2–0.6 ml cystic fluid mixed with provided collection vial store for < 3 h at room temperature. Shipping frozen	Minimal of 0.2 ml cyst fluid Provided kit with frozen shipping blocks
<i>Performance in Diagnosing Mucinous Neoplasm or LGD</i>		
Sensitivity*	90 to 98 %	70 to 88.9 %
Specificity*	94 to 100 %	77.1 to 90.1 %
<i>Performance in Diagnosing HGD or Carcinoma</i>		
Sensitivity*	82 to 88 %	80 to 100 %
Specificity*	98 to 100 %	81.3 to 99 %
Unique Features	Large panel of pancreas tumor-related genetic alteration.	Integrated molecular pathology reports that combine molecular and biochemical analysis, in the context of each patient's clinical history, imaging, fluid chemistry and cytology test results.
References	[47,63,73–75]	[67,69,76–78]

Patient
DOB/Age/Sex
Client Identifier
Collection Date
Accession Date
Reported Date

Accession #:
Client Accession #:
BM/DOB:
Client / Ordering Laboratory
Requesting Physician
Ordering Physician

CLINICAL HISTORY

Specimen Type: Pancreas, Cyst fluid Location: Pancreatic cyst

PANCREASEQ® GC RESULTS SUMMARY

Test Result	Type of Cyst	Risk of High-Grade Dysplasia/Cancer
POSITIVE	Mucinous (IPMN/MCN)	Elevated *See interpretation below for details

INTERPRETATION

- KRAS mutation together with high risk molecular alterations (TP53 and SMAD4) was detected in this cyst fluid sample.
- The detection of KRAS mutations in codons 12, 13 and/or 61 is associated with the presence of an intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) or mucinous cystic neoplasm (MCN).
- In addition, studies have shown the presence of additional alterations in TP53, PIK3CA, PTEN, AKT1 and SMAD4 correspond to an increased likelihood (~80%) of progression to high-grade dysplasia and early invasive pancreatic ductal adenocarcinoma. In these cases, a close surveillance plan and surgical consideration for young, fit patients is recommended.
- Patient management decisions must be based on the independent medical judgment of the treating physician. Molecular test results should be taken into consideration in conjunction with all relevant imaging and clinical findings, patient and family history, as well as patient preference.

DETAILED RESULTS

Sample cellularity: **ADEQUATE**

Marker Type	Marker Result	AF	Class
Gene mutations	KRAS	p.G12V c.35G>T	18% Tier 1/2
	TP53	p.G279E c.836G>A	10% Tier 1/2
Gene fusions	Negative		
Copy number alterations	Positive, SMAD4		