

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ**

**IMPACTUL ECOENDOSCOPIEI ÎN  
DIAGNOSTICUL PRECOCE ȘI PROGNOSTICUL  
TUMORILOR PANCREATICE**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. MIRCEA DICULESCU**

**Student-doctorand:**

**CĂTĂLINA VLĂDUȚ (DIACONU)**

## CUPRINS

INTRODUCERE.....	pagina 10
I. PARTEA GENERALĂ.....	pagina 14
1. Adenocarcinomul pancreatic.....	pagina 14
1.1. Epidemiologie – date globale și naționale.....	pagina 14
1.2. Etiopatogeneză și factori de risc.....	pagina 15
1.2.1. Factori genetici .....	pagina 15
1.2.2. Factori de mediu .....	pagina 18
1.2.3. Patologia și patogeneza adenocarcinomului pancreatic.....	pagina 23
1.2.3.1. Patologie .....	pagina 23
1.2.3.2. Patogeneză.....	pagina 27
1.3. Diagnosticul adenocarcinomului pancreatic.....	pagina 39
1.3.1. Diagnostic clinic.....	pagina 39
1.3.2. Diagnostic de laborator.....	pagina 41
1.3.3. Diagnostic imagistic.....	pagina 43
1.3.4. Diagnostic endoscopic.....	pagina 49
1.3.5. Diagnostic chirurgical.....	pagina 53
1.3.6. Examen bioptic.....	pagina 54
1.3.7. Diagnostic diferențial .....	pagina 55
2. Modalități actuale de tratament în adenocarcinomul pancreatic.....	pagina 57
2.1. Tratament adenocarcinomului pancreatic localizat rezecabil.....	pagina 58
2.2. Tratamentul adenocarcinomului pancreatic borderline.....	pagina 62
2.3. Tratamentul adenocarcinomului pancreatic local avansat.....	pagina 63

2.4. Tratamentul adenocarcinomului pancreatic metastatic .....	pagina 65
2.4.1. Tratamentul icterului.....	pagina 65
2.4.2. Tratamentul obstrucției duodenale.....	pagina 65
2.4.3. Managementul durerii.....	pagina 66
2.4.4. Prevenția malnutriției.....	pagina 68
2.4.5. Tratamentul insuficienței pancreatice exocrine sau endocrine.....	pagina 68
2.4.6. Tratamentului sistemic chimioterapeutic.....	pagina 68
2.4.7. Tratamentul de prevenție a bolii tromboembolice.....	pagina 70
3. Noi direcții în managementul adenocarcinomului pancreatic.....	pagina 71
3.1. Noi direcții în tratamentul ADCP - medicina personalizată.....	pagina 71
3.2. Nevoia de noi biomarkeri .....	pagina 72
II. PARTEA SPECIALĂ.....	pagina 75
4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale .....	pagina 75
5. Metodologia generală a cercetării.....	pagina 77
5.1. Populația studiată. Criterii de includere si non-includere în studiu...	pagina 77
5.2. Protocol de studiu.....	pagina 78
5.3. Protocol de prelevare a probelor.....	pagina 80
5.4. Protocol de analiză a probelor.....	pagina 81
5.5. Baza de date.....	pagina 81
5.6. Funcții statistice utilizate în acest studiu.....	pagina 81
6. Corelații epidemiologice, clinice, biologice, imagistice si endoscopice la pacienții cu adenocarcinom pancreatic.....	pagina 83

6.1. Introducere.....	pagina 83
6.2. Materiale și metodă.....	pagina 84
6.3. Rezultate.....	pagina 87
6.4. Discuții.....	pagina 107
6.5. Concluzii .....	pagina 112
7. Expresia miARN în adenocarcinomul pancreatic.....	pagina 114
7.1. Introducere.....	pagina 114
7.2. Material și metodă.....	pagina 115
7.2.1. Izolarea microARN.....	pagina 115
7.2.2. Determinarea calității și a cantității ARN total.....	pagina 117
7.2.3. Identificarea expresiei microARN... ..	pagina 119
7.3. Rezultate.....	pagina 127
7.4. Discuții.....	pagina 143
7.5. Concluzii.....	pagina 157
8. Concluzii, contribuții personale și direcții viitoare.....	pagina 160
8.1. Concluzii.....	pagina 160
8.2. Contribuții personale.....	pagina 161
8.3. Direcții viitoare.....	pagina 163
Bibliografie.....	pagina 164
Listă lucrări științifice publicate.....	pagina 175
Anexe.....	pagina 177

## INTRODUCERE

Cancerul pancreatic reprezintă o problemă majoră de sănătate din cauza agresivității sale și dificultății stabilirii diagnosticului precoce. Adenocarcinomul pancreatic (ADCP) este cea mai frecventă formă de cancer pancreatic, fiind subiectul cercetării noastre.

Diagnosticul de ADCP este realizat predominant prin intermediul explorărilor imagistice și endoscopice (ecoendoscopia), întrucât tabloul clinic și investigațiile de laborator sunt prea puțin specifice la momentul actual. Tratamentul se face în echipă multidisciplinară, însă întrucât majoritatea pacienților se prezintă la spital în forme avansate, tratamentul fiind predominant paleativ.

Ecoendoscopia a devenit esențială în diagnosticul și tratamentul afecțiunilor pancreatice. Aceasta oferă informații suplimentare cu ajutorul modulelor integrate: elastografie, utilizarea modulului Doppler color, folosirea substanței de contrast și mai ales oportunitatea efectuării biopsiei sau puncției fin aspirative. Posibilitatea de a preleva țesut tumoral prin manevră minim invazivă (puncție fin aspirativă sau puncție biopsie cu ac fin) este importantă atât pentru diagnosticul și prognosticul ADCP, cât și în domeniul cercetării, oferind posibilitatea testării moleculare a probelor tisulare.

Din ce în ce mai mulți pacienți cu această patologie se adresează clinicii noastre, incidența fiind în creștere atât la nivel național, cât și la nivel global. Prin intermediul acestui studiu am dorit să fac un prim pas în întâmpinarea acestei probleme, căutând markeri de diagnostic precoce și de prognostic în ADCP folosind ecoendoscopia și modulele sale integrate. Întrucât CA 19-9 nu este un biomarker viabil decât în cazuri selectate, căutarea noastră s-a axat pe expresia miARN în ADCP și identificarea altor parametri de diagnostic și prognostic în ADCP.

În concordanță, ADCP rămâne una dintre cele mai întâlnite teme în rândul congreselor de specialitate. Acest aspect este evidențiat și în cazul literaturii de specialitate, existând din ce în ce mai multe studii pe această temă. Cercetarea în acest domeniu prezintă creștere exponențială, fiind facilitată de inovațiile tehnologice. Cercetarea națională pe acest domeniu nu este încă amplă, existând studii rare referitoare la identificarea biomarkerilor noi în ADCP.

Rezultatele cercetării au constituit punctul de plecare pentru 2 articole originale ISI publicate în reviste internaționale: *Cells* (ISSN: 2073-4409, IF: 6.600) și *Endoscopy* (ISSN: 1438-8812, IF:10.093).

## I. PARTEA GENERALĂ

Cancerul pancreatic reprezintă una dintre cele mai mortale forme de cancer, atât prin prezentarea tardivă la medic cu forme ce nu mai prezintă indicație de tratament curativ, dar și prin lipsa metodelor de diagnostic precoce. În ciuda evoluției în pancreatologie prin apariția imunoterapiei și îmbunătățirile din chirurgia pancreatică, supraviețuirea la 5 ani este sub 10% (1).

În **Capitolul 1** sunt descrise date epidemiologice, etiopatogeneza și factorii de risc, respectiv modalități de diagnostic ale adenocarcinomului pancreatic. Riscul de cancer pancreatic este crescut direct proporțional cu vârsta, rareori diagnosticat înaintea vârstei de 55 de ani. Incidența maximă este între 65 și 69 pentru bărbați, respectiv 75 și 79 pentru femei. Cancerul pancreatic este mai frecvent întâlnit în țările dezvoltate, cel mai probabil datorită accesibilității crescute a metodelor de diagnostic și tratament (2; 3). Supraviețuirea la 5 ani pentru boală metastatică este de 2.9%, 12.4% pentru boală regională și 37.4% pentru boală localizată (2). 80% din pacienții nou diagnosticați au formă metastatică, iar dintre cei operabili 80% vor prezenta metastaze locale sau la distanță (1; 3).

Medicina preventivă se adresează regăsirii factorilor de risc implicați în etiopatogeneza ADCP. Fumatul, consumul de alcool, obezitatea, dieta bogată în carne roșie, expunerea la substanțe toxice sunt factori de risc ce pot fi modificați, importanți prin posibilitatea înlăturării lor. Vârsta înaintată, sexul masculin, etnia afroamericană, antecedente personale patologice de infecții cronice sau de pancreatită cronică, prezența diabetului zaharat, grupul sanguin B, antecedentele heredocolaterale de ADCP sunt factori de risc ce nu pot fi modificați, însă pot atenționa medicul referitor la riscul asociat de cancer pancreatic. Riscul de ADCP este cel mai mare în rândul pacienților cu grup sanguin B, pacienții cu grup sanguin A și AB prezentând risc intermediar (4).

Cele mai multe cazuri de ADCP sunt sporadice, doar 10-15% având o cauză genetică (3; 5). Există două categorii de risc ereditar în ADCP: sindroame ce prezintă mutație bine definită și cancer familial pancreatic. Din prima categorie fac parte: sindromul cancerelor de sân și ovarian ereditare (mutație BRCA1, BRCA2, PALB2), sindromul Lynch II (mutație MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), sindromul Peutz-Jeghers (mutație STK11), sindromul familial de melanom multiplu atipic (mutație CDKN2A), pancreatita ereditară (mutație SPINK1, CFTR). Ataxie-teleangiectazie, sindromul Li-Fraumeni, polipoza adenomatoasă familială, cancerul colonic ereditar non-polipozic,

anemia Fanconi sunt rareori incriminate în etiologia ADCP (3; 5; 6; 7). Cancerul familial pancreatic se bazează pe formarea de grupuri („cluster”) intrafamiliale, fără a se identifica un sindrom de susceptibilitate genetică, mai frecvent în rândul pacienților mai tineri (vârsta medie de 68 de ani) (8).

Patogenic ADCP se dezvoltă din elementele exocrine glandulare (celule ductale și acinare). Macroscopic se prezintă ca o leziune dură, imprecis delimitată. 60-70% sunt localizate cefalic, 5-10% corporeal, 10-15% caudal. În cazul formelor avansate metastazele pot apărea la nivel (ordonate în ordinea frecvenței): ganglionar, hepatic, peritoneal, pulmonar, pleural, osos (3). Microscopic adenocarcinoamele pancreatice pot fi clasificate în funcție de gradul de diferențiere în: bine diferențiate (grad 1), moderat diferențiate (grad 2) și slab diferențiate (grad 3). Una dintre semnăturile microscopice ale adenocarcinomului pancreatic este dată de prezența *stromei desmoplastice* (5). ADCP poate deriva din leziuni premaligne secundar modificărilor genetice: neoplasm mucinos chistic, neoplasm intraductal tubulopapilar, neoplasm intraductal oncotic, neoplasm intraductal papilar mucinos (cel mai frecvent incriminat) (6; 9). Tumorigeneza pancreatică se datorează unui amalgam de evenimente, suprapunând efectele mutațiilor genetice intracelulare multiple cu existența interacțiunilor celulare anormale și anomaliile morfologice ale țesutului pancreatic. Rolul celulelor stelate pancreatice a căpătat din ce în ce mai mult interes în ADCP, întrucât acestea sunt activate încă din stadiul de PanIN (10). În fazele inițiale celulele tumorale se sustrag recunoașterii, proces numit imunoeditarea tumorală, prin pierderea antigenelor de suprafața drept consecință a instabilității genetice a tumorii și diviziunii celulare continue. Neoangiogeneza apare secundar proliferării angioblaștilor sub influența VEGF și FGF, ducând la apariția celulelor endoteliale imature. Mutațiile somatice cel mai des întâlnite în ADCP includ următoarele gene: KRAS, CDKN2A, TP53, SMAD3, MLH1, MSH2, MSH6 (5; 10; 11).

Noi biomarkeri precum micro-ARN circulant (serici sau din plasmă, din lichid pancreatic, din salivă, din materiile fecale) sau tisulari, ADN circulant, ARN non-codant au fost descoperiți încercând a determina noi metode de diagnostic precoce. MicroARN sunt fragmente scurte de ARN, necodante care reglează expresia altor gene, fiind implicate în reglarea post-transcripțională a expresiei genice sau prin inhibiția procesului de translație (12). miARN pot fi oncomir prin supraexpresia protooncogenelor și/sau supresoare prin supresia protooncogenelor (13).

Diagnosticul clinic în ADCP nu oferă multe informații fiind nespecific, însă în formele precoce predomină următoarele simptome: dureri abdominale, meteorism, flatulență, diaree, vărsături, stare de rău general (3; 14). Icterul, hepatomegalia, palparea unei formațiuni în cadranul superior drept, cașexia, ascita, semnul Courvoisier sunt cele mai frecvente semne în ADCP (15; 6). Grupul European Cooperativ Oncologic (ECOG) a standardizat gradul de capacitate funcțională, fiind un factor de prognostic major, valorile crescute fiind asociate supraviețuirii scăzute (5).

Diabetul zaharat și glicemia bazală modificată sunt întâlnite la 85% din pacienți la diagnostic, iar 55-85% din cazuri au acest diagnostic în primii 2 ani de la diagnostic. CA 19-9 este singurul biomarker util în cazuri selecționate precum imediat după tratamentul neoadjuvant, preoperator, imediat postoperator înainte de tratamentul adjuvant și pentru supravegherea postoperatorie. Cu toate acestea CA 19-9 prezintă specificitate redusă, putând fi crescut nespecific și în patologii non-maligne (16; 17). Rare studii demonstrează importanța raportului neutrofile/limfocite (RNL) în prognosticul ADCP, valori peste 5 fiind asociate cu supraviețuirea scăzută (18).

Imagistica este standardul de aur în diagnosticul adenocarcinomului pancreatic, reprezentat de tomografie computerizată multidetector cu protocol pancreatic sau imagistică prin rezonanță magnetică, însă completarea informațiilor cu investigațiile endoscopice (EUS) a devenit esențială în pancreatologie (19). CT ajută la stadializarea conform criteriilor de rezecabilitate a cancerului pancreatic (6; 20). IRM cu contrast cu protocol pancreatic poate fi util în stadializarea ADCP, îndeosebi pentru a caracteriza leziunile hepatice ce nu pot fi descrise corespunzător CT, în caz de suspiciune de tumori pancreatice ce nu pot fi vizualizate CT sau în caz de alergie la substanța de contrast, întrucât utilizează agenți de contrast non-iodați (19). Colangiopancreatografia asociată IRM-ului (MRCP) poate fi utilizată ca metodă de diagnostic pentru pacienții icterici ce nu pot efectua ERCP: obstrucție gastrică prin efectul de masă al tumorii sau cu eșec al ERCP-ului (6). PET-CT poate fi asociat cu CT cu protocol pancreatic doar în rândul pacienților cu risc înalt pentru detecția metastazelor, observând activitatea funcțională diferită a ADCP față de masele benigne (ce nu captează traser cu excepția leziunilor inflamatorii în pancreatita cronică) (6; 16).

Ecoendoscopia este complementară CT, având sensibilitate și specificitate crescută îndeosebi pentru tumorile sub 3cm (3; 21). EUS este esențială în managementul pacienților cu patologie pancreatică și a deschis noi porți în studiul molecular al ADCP.



Tehnici asociate EUS ce prezintă un avantaj major în ADCP sunt: puncție fin aspirativă (FNA) sau biopsie cu ac fin (FNB) prin mișcări „du-te-vino” permițând detașarea și aspirarea celulelor, evaluare Doppler color, EUS cu contrast vascular, elastografie (22; 23). Colangiopancreatografia retrogradă este utilizată rareori diagnostic, prezentând scop terapeutic la acest moment prin montarea de stenturi (18). Indicația de laparoscopie exploratorie rămâne în cazul în care explorările imagistice ridică suspiciunea bolii metastatice oculte, în cazul tumorilor borderline înainte de tratament neoadjuvant sau în cazul în care există indicatori clinici sau paraclinici care nu sunt în concordanță cu stadiul imagistic (noduli limfatici de mari dimensiuni, scădere ponderală excesivă, dureri abdominale importante, CA 19-9 peste 100 U/mL) (19). Examenul biptic poate fi obținut prin puncție ecoghidată sau CT, prin ecoendoscopie (puncție fin aspirativă sau puncție biopsie cu ac fin fiind metodele prederate) sau chirurgical. Societatea de Citopatologie Papanicolau a pus bazele unui sistem standardizat de evaluare a citologiei pancreatice, structurat în 6 categorii: „nondiagnostic”, „negativ”, „atipic”, „neoplasic”, „suspect pentru malignitate” și „pozitiv pentru malignitate” (24).

Diagnosticul diferențial al ADCP se face cu pancreatita cronică, pancreatita autoimună, tumorile neuroendocrine pancreatice, limfomul primitiv pancreatic, neoplazia intraepitelială pancreatică, determinările secundare din tumori primare extrapancreatice (6).

În **Capitolul 2** sunt prezentate modalitățile actuale de tratament în adenocarcinomul pancreatic. Tratamentul ADCP depinde de stadiul bolii (Figura 1). Chirurgia este singurul tratament cu scop curativ însă rezervat pacienților cu tumora rezecabilă sau borderline rezecabilă (luată în calcul după tratamentul neoadjuvant). Deși au existat progrese în medicină, nu a fost descoperit un tratament medicamentos eficient în ADCP. S-au identificat mutații ce pot fi țintite medicamentos, însă studii suplimentare sunt încă necesare pentru certificarea datelor.

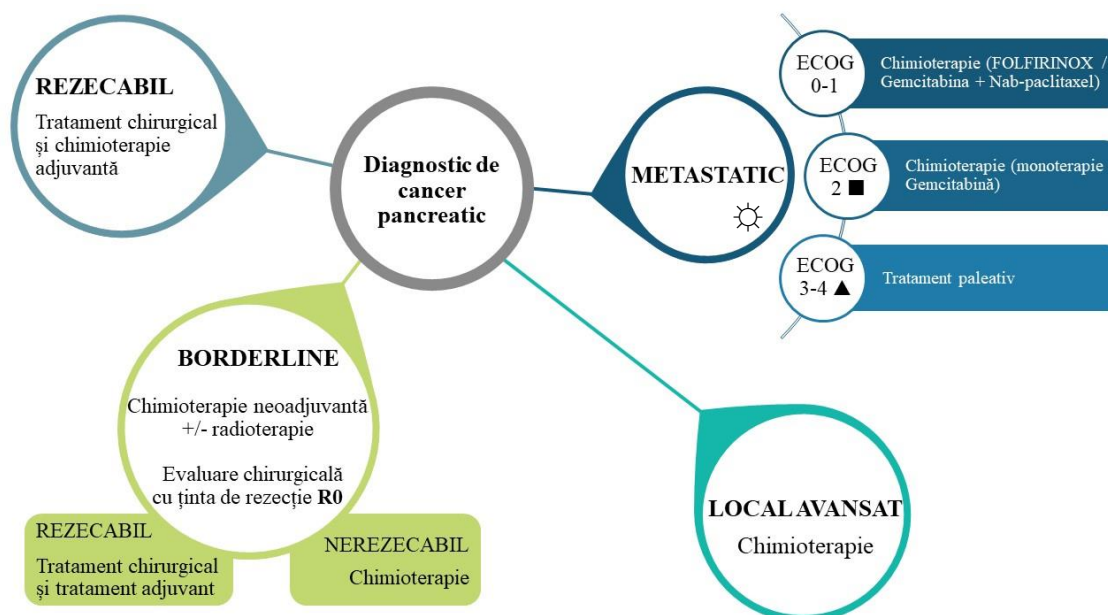


Figura 1. Tratamentul în ADCP (25); ■ Status de performanță 2 și/sau bilirubina totală peste 1.5x N; ▲ Status de performanță 3-4 sau pacient cu comorbidități  
☀️ Imunoterapia se recomandă la pacienții cu ADCP local avansat sau metastatic și mutații MMR și MSI (Pembrolizumab, mutații NTRK (Larotrectinib sau Entrectinib), mutații BRCA1 sau BRCA2 (Olaparib ca linia a doua) (26)

Noi direcții în managementul adenocarcinomului pancreatic sunt prezentate în **Capitolul 3**. Noile direcții în tratamentul ADCP fac referire la medicina personalizată, aducând în prim plan tratamentele țintite împotriva genelor, moleculelor, căilor de semnalizare afectate sau chiar miARN. Terapia țintită luând în calcul profilul miARN oferă avantajul că un singur tip de microARN poate ținti simultan mai multe gene. Determinarea biomarkerilor genomici a căpătat amploare prin intermediul spectrofotometriei și secvențierii genomului. miARN pot fi folosiți atât în preconizarea riscului de transformare malignă a leziunilor pancreatice premaligne, rol diagnostic, cât și prognostic. miARN pot preconiza agresivitatea cancerului pancreatic sau chiar pierderea sensibilității la tratament chimioterapeutic sau radioterapeutic. Biomarkerii proteomici sunt reprezentați de proteine derivate din tumoră, decelabile din linii celulare, țesut tumoral, suc pancreatic și sânge (6). Biopsia lichidă este în curs de evaluare fiind considerată o metodă de detecție precoce a ADCP ce constă în determinarea celulelor tumorale circulante, acizilor nucleici circulanți liberi, microveziculelor ce conțin exozomi. În ciuda tuturor avantajelor, biopsia lichidă prezintă anumite limitări: sensibilitatea scăzută comparativ cu biopsiile clasice prin raritatea celulelor tumorale

circulante și acizilor nucleici circulanți în sângele pacienților, posibilitatea altei surse extra-pancreatice, lipsa consensului referitor la metodologia prelevării (27).

## II. PARTEA SPECIALĂ

Ipoteza de lucru și obiectivele generale sunt descrise în **Capitolul 4**. Scopul cercetării de față este de a evalua mijloacele de diagnostic, markeri sau scoruri ce sunt utilizate în ADCP și de a dezvolta noi markeri de diagnostic și prognostic. Aportul personal a fost structurat în două studii separate, însă interconectate.

În primul studiu am caracterizat lotul studiat conținând 43 de pacienți diagnosticați cu ADCP utilizând EUS-FNA (din cohorta inițială de 57 de pacienți) prin evaluarea detaliată a parametrilor epidemiologici, clinici, biologici, imagistici, ecoendoscopici și histologici (probele bioptice fiind obținute prin EUS-FNA). Ecoendoscopia ne-a oferit posibilitatea analizei probelor bioptice, fiind o procedură minim invazivă, esențială în managementul pacienților cu ADCP. Am corelat acești parametri cu criteriile de agresivitate ale ADCP: dimensiunea tumorii, existența metastazelor, invazia vasculară și supraviețuirea.

În al doilea studiu am urmărit determinarea expresiei miARN în ADCP din probele obținute prin puncție fin aspirativă ecoendoscopic ghidată de la 41 de pacienți, evaluate prin RT-qPCR. Am urmărit identificarea semnăturii miARN în țesutul tumoral recoltat de la pacienții cu adenocarcinom pancreatic, comparând profilului miARN din ADCP cu profilul miARN din patologii non-maligne. Pentru aceasta am folosit 2 loturi: *lotul comparativ* constituit din probe de țesut de pancreatită cronică, prelevate prin puncție fin aspirativă ecoendoscopic ghidată și *lotul control* constituit din probe de țesut pancreatic normal peritumoral provenite din biobanca Institutului Național de Patologie Victor Babeș. Lotul de studiu constituit inițial din 43 de pacienți în rândul cărora s-a realizat analiza profilului miARN, a fost modificat prin excluderea ulterioară a 2 pacienți. Acest lucru s-a realizat cu ajutorul softului de prelucrare statistică SPSS, programul pentru detecția valorilor mult diferite față de media grupului studiat (outlier detection). Excluderea din lotul de studiu s-a realizat în baza PCA Analysis (Principal Component Analysis) care încadrează pacienții în funcție de expresia miARN total. Ipoteza primară constă în corelarea expresiei miARN tisulare (prelevate ecoendoscopic din rândul pacienților cu ADCP) cu caracteristici clinice, biologice și imagistice ale pacienților, caracterul agresiv al tumorii, răspunsul la tratament specific și factorii prognostici.

Obiectivele generale ale studiului sunt reprezentate de:

1. Stabilirea corelațiilor între parametrii epidemiologici, clinici, biologici, endoscopici respectiv histologici (probele bioptice fiind obținute prin EUS-FNA) și caracterul agresiv al adenocarcinomului pancreatic;
2. Identificarea profilului miARN specific țesutului tumoral malign pancreatic, prin comparație cu țesutul normal peritumoral, respectiv cu țesut din pancreatită cronică;
3. Identificarea corelațiilor între expresia modificată a unui panel de miARN tumoral prelevat ecoendoscopic (din rândul pacienților cu adenocarcinom pancreatic) și caracteristicile clinice, biologice, imagistice și endoscopice ale pacienților, caracterul agresiv al tumorii, răspunsul la tratament specific și supraviețuirea;
4. Obiectivarea cu ajutorul bioinformaticii (DIANA TarBase) a căilor de semnalizare și a genelor țintă ale miARN ce prezintă expresie modificată în lotul de studiu.

Metodologia cercetării este prezentată în **Capitolul 5**. S-a efectuat un studiu prospectiv, observațional, multicentric ce a inclus 57 de pacienți cu tumoră pancreatică solidă (diagnosticată imagistic) în perioada martie 2019 – septembrie 2021. Urmărirea pacienților s-a desfășurat pe parcursul a 2 ani și 6 luni (până la finalizarea studiului), constând în vizite telefonice periodice la o lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 2 ani, respectiv 2 ani și jumătate, colectând următoarele date: anamneza și scor ECOG.

Întrucât discutăm despre un studiu multicentric, contribuția mai multor centre medicale a fost facilitată de buna colaborare între experții în domeniu. Spitalele partenere în studiu sunt reprezentate de: Spitalul Clinic de Urgență “Prof Dr Agrippa Ionescu”, Spitalul Universitar de Urgență Militar Central “Dr Carol Davila” și Spitalul Clinic de Urgență București, în colaborare cu Institutul Național de Patologie Victor Babeș. Studiul a fost demarat după ce au fost obținute acordurile comisiilor de Etică din cadrul spitalelor partenere în studiu și acordurile șefilor de secție ale Clinicilor de Gastroenterologie. Aspectul multidisciplinar al acestei cercetări constă și în colaborările dintre diferite specialități gastroenterologie, anatomopatologie și biologie moleculară. Echipele de gastroenterologie au fost responsabile de evaluarea și diagnosticarea pacienților: clinic, anamnetic, biologic, imagistic și ecoendoscopic cu prelevarea probei bioptice. Examinarea endoscopică a fost realizată în cadrul Laboratorului de Endoscopie Digestivă

a spitalelor partenere, urmată de evaluarea histopatologică din cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică dedicat. Evaluarea expresiei miARN din proba bioptică a fost realizată în cadrul Laboratorului de Histopatologie și Imunohistochimie a Institutului Național de Patologie Victor Babeș. Prezentul studiu a fost înregistrat în baza de date clinicaltrials.gov cu numărul deregistrare NCT04765410.

Populația de studiu a constat în pacienți diagnosticați imagistic cu o masă tumorală solidă pancreatică, net identificată sau suspionată (computer tomograf și/sau rezonanță magnetică nucleară) care se prezintă pentru realizarea unei puncții fin aspirative ghidată ecoendoscopic (EUS FNA). Criteriile de includere în studiu au fost următoarele: prezența unei formațiuni solide pancreatice, cu diagnostic anatomopatologic necunoscut; vârsta peste 18 ani; existența unui consimțământ informat semnat. Criteriile de non-includere au fost următoarele: prezența unei formațiuni solide pancreatice cu diametru mai mic de 10mm sau cu histologie cunoscută sau a unei mase chistice pancreatice, fără componentă solidă; tulburări de coagulare prezente (INR > 1.5, APTT > 42 secunde, trombocitopenie < 60 000/mm<sup>3</sup>) sau imposibilitatea de a opri antiagregantele sau anticoagulatele conform ghidurilor Societății Europene de Endoscopie Digestivă (ESGE); sarcină în evoluție; vârsta sub 18 ani; refuzul sau imposibilitatea obținerii consimțământului informat; prezența de structuri vasculare sau canal Wirsung dilatat, interpus pe traiectul acului de puncție, între locul de intrare al acului și leziunea solidă pancreatică, neputând fi ocolită în cursul puncției și crescând riscurile procedurii de puncție (decizia medicului endoscopist); prezența unei alte malignități la același pacient ce poate interfera cu biomarkerii determinați. Participarea la alte studii clinice nu reprezintă un criteriu de non-includere.

Protocolul de studiu a urmărit înrolarea și evaluarea celor 57 de pacienți în studiu și efectuarea anamnezei și examenului obiectiv. După explicarea diagnosticului, riscurilor și beneficiilor protocolului de cercetare, pacientul a semnat consimțământului informat pentru participare la studiu. Ulterior s-au prelevat probe biologice (parametrii relevanți pentru boala de bază) și s-a efectuat EUS-FNA când s-au recoltat probe bioptice: minim 2 pasaje (unul a fost direcționat studiului). Acesta a fost preservat prin imersare imediată după biopsiere în soluții de stabilizare a ARN (RNAlater), menținut la frigider 24-48h. Probele bioptice prelevate EUS-FNA (care nu au fost direcționate studiului) au fost analizate histopatologic pentru confirmarea diagnosticului (Figura 2). Probele de țesut

imersate în soluție s-au scos din tampon și s-au păstrat la  $-80^{\circ}\text{C}$  până la izolarea ARN. Au urmat anumiți pași specifici pentru a putea obține expresia unui panel de 84 de miARN.

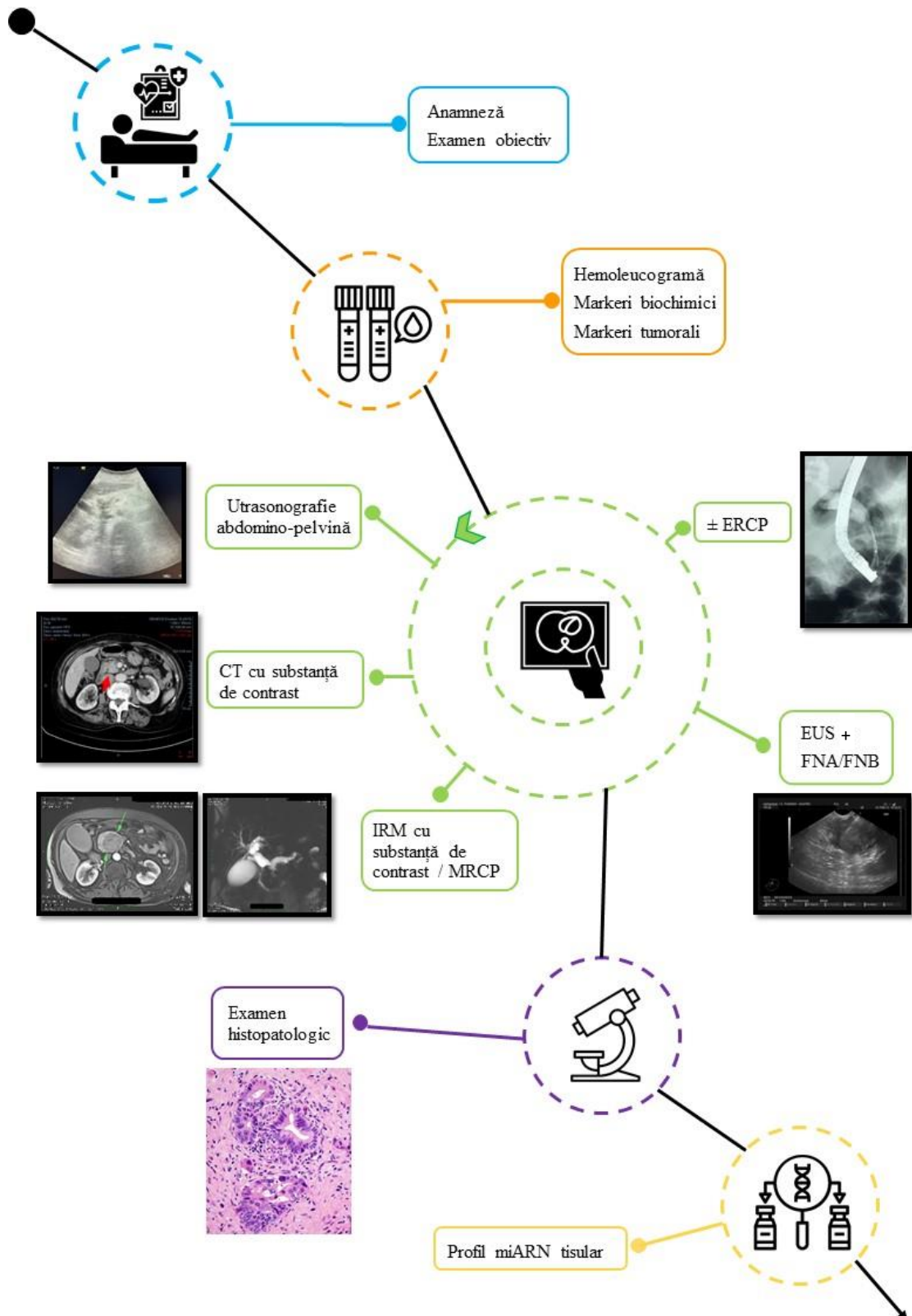


Figura 2. Pașii procedurali urmați de pacienții din studiu: după anamneză și examenul obiectiv s-au prelevat probe biologice, ulterior pacienții au efectuat investigații

*imagistice și endoscopice (EUS-FNA – minim 2 pasaje, unul fiind plasat într-o eprubetă specială ce conține RNA-later ce va fi trimisă către Institutul Victor Babeș pentru profilul miARN). Proba obținută endoscopic (nu cea imersată în RNA-later) a fost trimisă către laboratorul de anatomie patologică și analizată, putând astfel confirma sau infirma diagnosticul de cancer pancreatic. Dacă diagnosticul a fost de ADCP, pacientul a rămas în cohorta de studiu (imaginile sunt preluate din arhiva proprie din cadrul Spitalului Clinic de Urgență București și Spitalului Clinic de Urgență “Prof Dr Agrippa Ionescu”)*

Izolarea microARN s-a realizat prin miRNeasy mini kit (Qiagen) iar identificarea expresiei miRNA cu ajutorul miRCURY LNA RT Kit, miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit și miRCURY LNA miRNA Focus panel (YASH – 102Y) (Qiagen, GmbH). Procedul de izolare se bazează pe liza probei cu fenol și tiocianat de guanidină, purificarea probei prin fixarea în membrană de siliciu a extractelor de ARN total și stocare la -80°C. Un punct de control obligatoriu în cadrul experimentelor de biologie moleculară este verificarea calității ARN total precum și determinarea concentrației, realizate prin spectrofotometrie în ultraviolet utilizând spectrofotometrul NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Studiul expresiei micro-ARN l-am realizat utilizând metoda PCR array prin obținerea ADN complementar și a amestecului de reacție, apoi amplificarea prin real-time PCR și în final analiza rezultatelor. Rezultatele obținute, exprimate în valori ale  $C_T$  (threshold cycle) au fost exportate într-un document Excel, urmate de analiza propriu-zisă. Dacă valoarea  $C_T$  a controlului Blank este  $\leq 35$ , amplificarea este nespecifică, iar rezultatele nu sunt corecte (se repetă reacția). Pentru fiecare placă se vor verifica replicatele pentru cele 3 IPC (interplates calibrator) iar dacă diferența dintre ele este  $\leq 0,5$ , rezultatele pot fi analizate. S-au calculat valorile fold change și fold regulation pentru a preciza puterea subexpresiei sau supraexpresiei.

Analiza statistică a fost realizată utilizând software Statistical Package for the Social Sciences SPSS (versiunea 28.0, SPSS Inc., Chicago, IL) și Microsoft Office Professional Plus 2016 Excel. Pentru reprezentările grafice s-au folosit SPSS, Excel și GfalicPad Prism 8.4.3. Folosind testul Shapiro-Wilk ( $<0.05$ ) am observat că distribuția datelor din al doilea studiu nu este normală, astfel au fost folosite teste non parametrice. Pentru analiza variabilelor categoriale am folosit testul Chi-Pătrat, întrucât în unele cazuri numărul de pacienți pe categorie a fost relativ redus. Coeficientul de corelare Pearson/Spearman a fost utilizat pentru a estima corelațiile între variabilele continue.

Testele t-test independente sau Mann-Whitney test au fost folosite pentru analiza datelor continue, exprimate drept medie  $\pm$  deviația standard sau eroare medie standard. Testul Kruskal-Wallis a fost folosit pentru compararea grupurilor și pentru compararea diversilor parametri din cadrul lotului de studiu dacă există minim 3 categorii. Semnificația statistică a fost dată de valori  $p < 0.05$  și fold regulation este semnificativă dacă este sub -2 sau peste 2. Pentru a evidenția diferențierea grafică a nivelului de exprimare a miARN în cele 3 loturi am utilizat harta calorică (heatmap), folosind GraficPad Prism 8.4.3.

Rezultatele corelațiilor epidemiologice, clinice, biologice, imagistice și endoscopice la pacienții cu ADCP au fost elaborate în **Capitolul 6**. Din cei 57 de pacienți înrolați în studiu: 45 au fost confirmați histopatologic cu ADCP, 5 pacienți au fost diagnosticați cu pancreatită cronică (constituind lotul comparativ în al doilea studiu); 1 pacient a fost diagnosticat cu limfom pancreatic primar, 6 pacienți nu au fost confirmați histopatologic cu ADCP. Din cei 45 de pacienți confirmați cu ADCP histopatologic, 2 pacienți au fost excluși întrucât proba bioptică nu a fost suficientă pentru a efectua prelucrarea miARN. Astfel au rămas 43 de pacienți ce au constituit lotul de studiu. În rândul acestora s-a făcut analiza parametrilor epidemiologici, clinici, biologici, imagistici, endoscopici și prognostici și s-au identificat posibile corelații între acești parametri cu caracteristicile agresive ale tumorii pancreatice.

Analizând cohorta de studiu s-a observat minimă preponderență a pacienților de sex feminin. Analizând supraviețuirea în funcție de sex în cohorta noastră, am observat că pacienții de sex feminin prezintă supraviețuire mai mare decât pacienții de sex masculin ( $p=0.026$ ), însă rezultatele pot fi influențate și de preponderența altor factori de risc în rândul pacienților de sex masculin (fumat, alcool).

Incidența maximă a pacienților cu ADCP se situează în decadele 7-8 de viață, similar datelor din studiul nostru (20). Există o corelație negativă între vârsta înaintată și supraviețuirea scăzută în cercetarea noastră ( $p=0.012$ ).

65.1% din pacienți provin din mediul urban, în timp ce doar 34.95% din pacienți provin din mediul rural, cel mai probabil datorită accesibilității crescute a metodelor de diagnostic și tratament pentru pacienții din zonele urbane.

Pacienții din lotul de studiu prezintă factori de risc modificabili întâlniți la analiza noastră: fumatul, consumul de alcool și expunerea la substanțe nocive; respectiv ce nu



pot fi modificați: vârsta înaintată, prezența altor comorbidități precum diabetul zaharat, antecedentele heredocolaterale de ADCP.

Durerea rămâne principalul simptom întâlnit la 88% din pacienți, deși nespecific în ADCP, urmată de scăderea ponderală și icterul sclerotegumentar ce au fost de asemenea identificate în proporție crescută la 74%, respectiv 40% din pacienți. Valoarea medie a IMC-ului fost de  $22.02 \pm 4.21$ , majoritatea pacienților fiind normoponderali.

Există diferențe semnificative statistice ale supraviețuirii între stadiile ECOG: cu cât stadiul ECOG crește, cu atât supraviețuirea scade ( $p=0.001$ ).

În lotul studiat doar 17.1% din pacienți au prezentat valori glicemice normale, în timp ce 32% au prezentat glicemie bazală modificată, fapt coroborat cu datele din literatura de specialitate. În cohorta noastră 82.9% din pacienți prezintă glicemie bazală modificată sau diabet zaharat, asemănător datelor obținute de *Modi* și colaboratorii săi care au arătat ca 40% din pacienții cu ADCP au glicemia bazală modificată și 85% din pacienții cu ADCP la diagnostic au diabet sau glicemia bazală modificată. Noi cercetări definesc diabetul apărut în patologia pancreatică drept diabet tip 3c (în trecut denumit diabet pancreatogen), apărut secundar insuficienței pancreatice endocrine. (3). CA 19-9 rămâne cel mai folosit biomarker la momentul de față, însă cu utilitate în cazuri selecționate. Un element interesant analizat în cohorta noastră este reprezentat de valorile normale CA 19-9 în rândul a 3 pacienți. Nu am identificat diferențe semnificative statistice între hemoglobină, RNL, albuminemie și supraviețuire.

60-70% din adenocarcinoamele pancreatice au localizare cefalică conform datelor din literatură, fapt confirmat și în studiul nostru ce demonstrează localizarea cefalică a ADCP în 60.5% din cazuri (2). Pacienții cu tumori cefalopancreatice se prezintă mai devreme la spital din cauza apariția precoce a simptomelor secundar contactului tumorii cu CBP. Astfel se justifică și asocierea valorilor mai mari ale markerilor de colestază (BR totală și directă, GGT) și hepatocitoliză (ALT, AST) cu localizarea cefalică pancreatică, legătură semnificativă din punct de vedere statistic în studiul nostru. Un element surprinzător este reprezentat de asocierea localizării cefalice tumorale cu valorile crescute ale CA 19-9 ( $p=0.032$ ) întrucât la diagnostic tumorile corporeo-caudale au dimensiuni mai mari, astfel fiind mai frecvent asociate cu valori mai mari ale CA 19-9.

90.69% din pacienții din studiu s-au prezentat cu forme inoperabile, însă nici un pacient nu este în formă rezecabilă de boală și doar 4 pacienți sunt borderline rezecabili

(9.31%). Conform stadializării TNM două treimi din lotul studiat sunt în stadiul IV de boală.

Supraviețuirea scăzută a fost asociată cu vârsta înaintată (Figura 3), statusul ECOG ridicat (Figura 4a), prezența metastazelor (Figura 4b) și dimensiunea mare a tumorii (Figura 5), asocieri ce au fost demonstrate semnificative statistic ( $p < 0.05$ ).

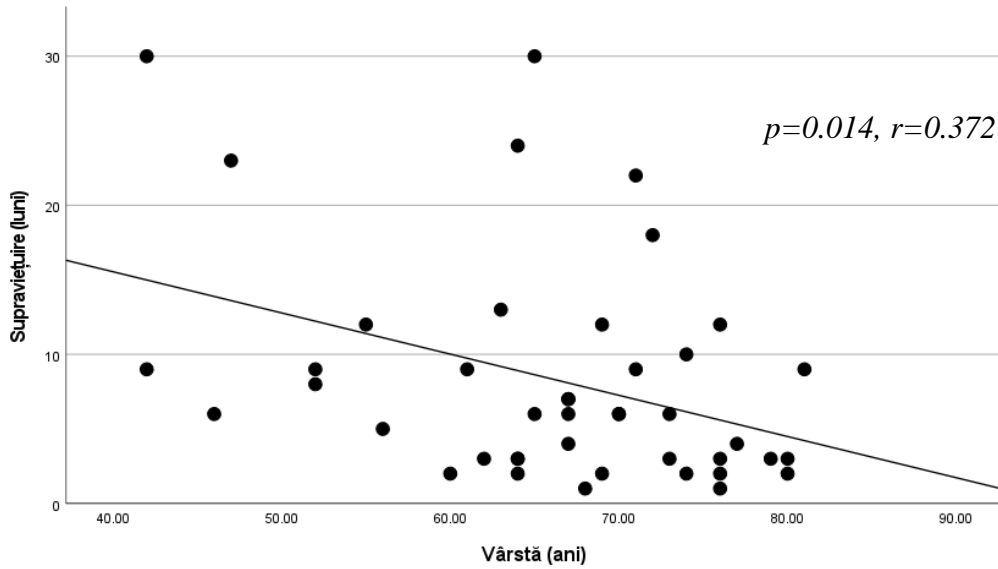


Figura 3. Corelație negativă statistic între vârsta înaintată și supraviețuirea scăzută prin test Pearson

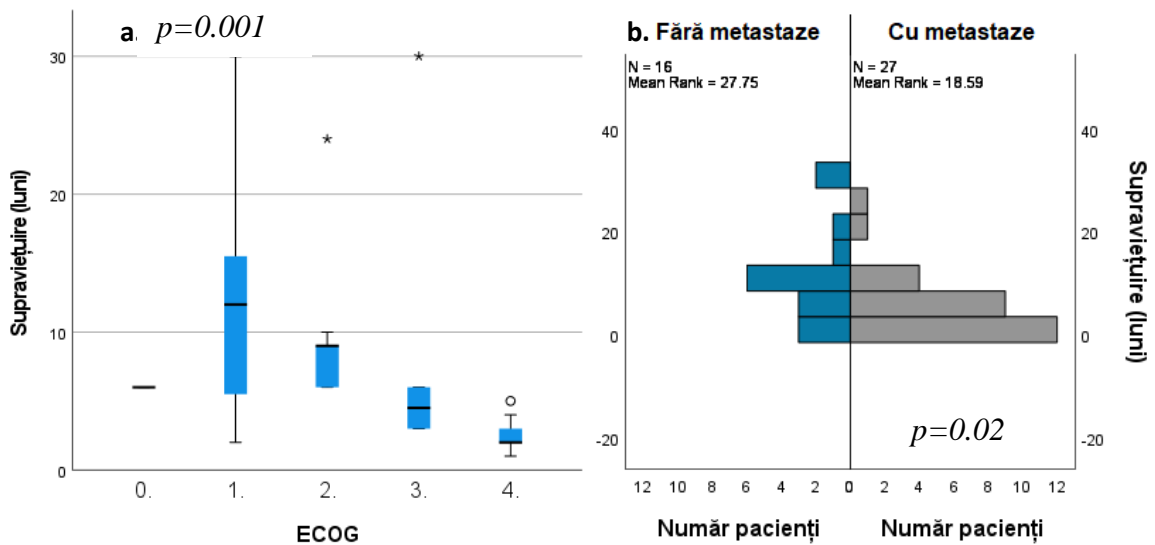


Figura 4. a. Diferențele de supraviețuire în funcție de categoria ECOG; b. Distribuția pacienților cu și fără metastaze în funcție de supraviețuire (corelație semnificativă statistică  $p=0.02$ )

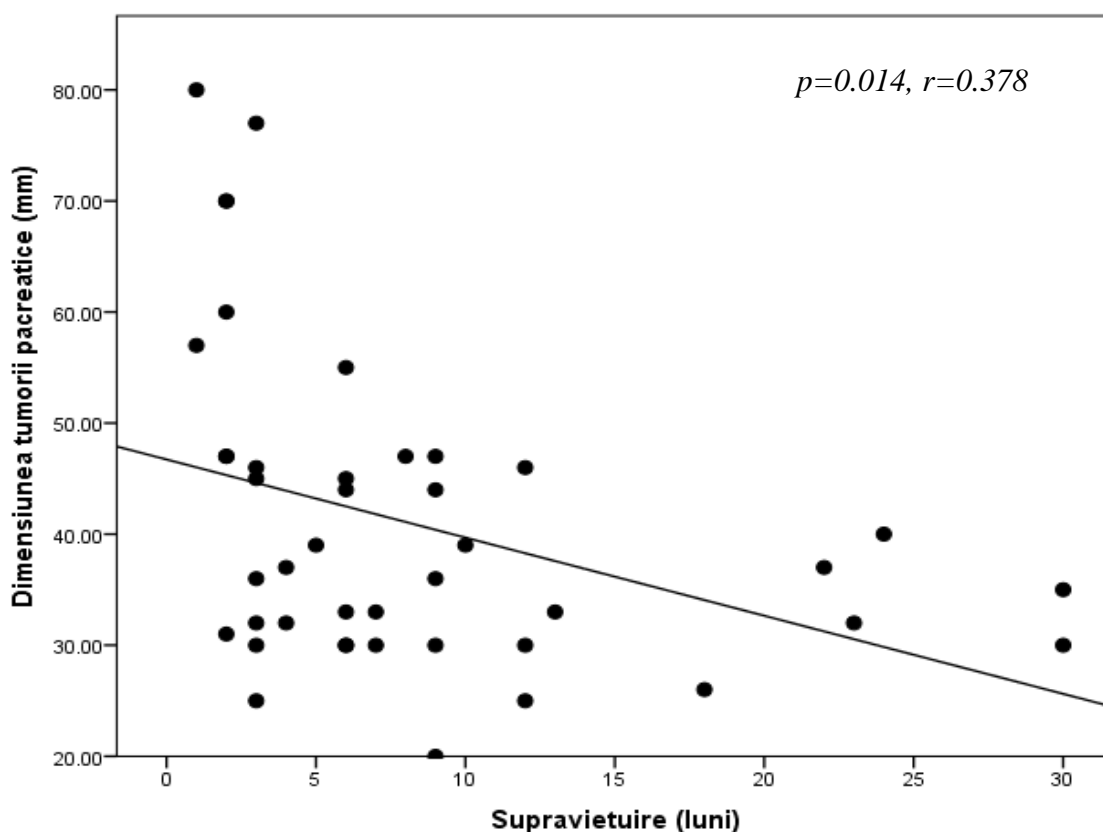


Figura 5. Corelație Pearson negativă semnificativă statistic între supraviețuire (luni) și dimensiunea tumorii (mm)

Expresia miARN tisulară în ADCP a fost analizată în **Capitolul 7**. miARN reprezintă 1-4% din genomul uman, controlând expresia a peste 60% din genele ce codifică proteine umane. Expresia fiziologică a miARN intervine în buna desfășurare a proceselor celulare: creșterea, diferențierea celulară și apoptoza. miARN sunt parametrii noi obținuți din produsele patologice ale pacientului (sânge, țesut, salivă, materii fecale, suc pancreatic) ce pot fi nu doar biomarkeri în diagnosticul ADCP, dar și markeri ai agresivității ADCP exprimați prin prezenta metastazelor, invaziei vasculare, dimensiunea crescută tumorală (12). Evidențierea expresiei miARN a fost analizată din probele biotice prelevate prin ecoendoscopie. Plecând de la cohorta din studiul anterior de 43 de pacienți, au fost excluși 2 pacienți consecutiv analizei prin softului de prelucrare statistică SPSS „outlier detection”, în baza PCA Analysis. Pentru analiza comparativă au fost create 2 loturi comparative: lotul 1 constituit din probe de țesut de la pacienți cu pancreatită cronică prelevate prin ecoendoscopie cu puncție fin aspirativă, numit *lotul comparativ*, respectiv lotul 2 constituit din probe de țesut pancreatic normal peritumoral (din biobanca Institutului de Patologie “Victor Babeș”) pe care îl vom numi *lotul control*. Pacienții din

lotul 1 au făcut parte din cohorta inițială de 57 de pacienți, însă consecutiv evaluării histologice și ulterior reevaluării imagistice a fost pus diagnosticul de pancreatită cronică.

În cele 3 loturi au fost analizate 84 miARN implicate în apariția și evoluția cancerului. Dintre aceste 84 miARN studiate, 3 miARN (miR-149-3p, miR-202-3p, miR-206) nu au fost detectate în țesuturile studiate ( $Ct > 35$ ) conform protocolului de lucru. La analiza comparativă între cele 3 gupuri prin testul Kruskal Wallis am observat că 75 de miARN sunt exprimate diferit între loturi (Tabel 1 și Figura 6).

*Tabel 1. Expresia diferită a profilului miARN în adenocarcinom pancreatic comparativ cu țesutul pancreatic normal peritumoral, respectiv comparativ cu pancreatita cronică*

		Lot de studiu (ADCP) vs lot control (țesut pancreatic normal peritumoral), analiza pair-wise		Lot de studiu (ADCP) vs lot comparativ (pancreatita cronică), analiza pair-wise	
miARN	Test Kruskal Wallis	p-value	FR ■	p-value	FR ■
let_7a_5p	<b>0.004</b>	0.717		<b>0.004</b>	<b>-15.34</b>
let_7b_5p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.033</b>	<b>-3.16184</b>	<b>0.004</b>	<b>-14.20</b>
let_7c_5p	<b>0.003</b>	0.311	-1.89073	<b>0.004</b>	<b>-9.59</b>
let_7d_5p	<b>0.007</b>	1		<b>0.005</b>	<b>-10.78</b>
miR_200a_3p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>-8.9012</b>	0.228	-3.16
let_7g_5p	<b>0.021</b>	0.501		<b>0.032</b>	<b>-8.47</b>
let_7i_5p	<b>0.044</b>	1		<b>0.037</b>	<b>-2.75</b>
miR_1	<b>0.005</b>	<b>0.02</b>	<b>-8.68729</b>	0.118	-2.46
miR_100_5p	<b>0.002</b>	<b>0.012</b>	<b>-4.10719</b>	0.051	-1.44
let_7f_5p	<b>0.009</b>	0.57		<b>0.011</b>	<b>-9.08</b>
miR_101_3p	<b>0.005</b>	0.172	-1.34124	<b>0.013</b>	<b>-8.86</b>
miR_103a_3p	<b>0.004</b>	1		<b>0.003</b>	<b>-8.08</b>
miR_106a_5p	<b>0.004</b>	1		<b>0.012</b>	<b>-15.45</b>
miR_106b_5p	<b>0.011</b>	1		<b>0.011</b>	<b>-9.72</b>
miR_107	<b>0.012</b>	1		<b>0.01</b>	<b>-8.03</b>
miR_125b_5p	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>-39.7994</b>	<b>0.03</b>	<b>-7.74</b>
miR_126_3p	<b>0.001</b>	<b>0.034</b>	<b>-3.22119</b>	<b>0.005</b>	<b>-26.97</b>
miR_130a_3p	<b>0.005</b>	0.153	-2.16855	<b>0.014</b>	<b>-21.96</b>
miR_132_3p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>-18.433</b>	<b>0.006</b>	<b>-13.39</b>

miR_10b_5p	<i>&lt;0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>-14.3183</i>	<i>0.019</i>	<i>-6.65</i>
miR_133a_3p	<i>0.001</i>	<i>0.011</i>	<i>-5.46625</i>	<i>0.023</i>	<i>-4.39</i>
miR_141_3p	<i>&lt;0.001</i>	<i>&lt;0.001</i>	<i>-54.4185</i>	0.09	-4.99
miR_143_3p	<i>&lt;0.001</i>	<i>0.002</i>	<i>-5.71145</i>	<i>0.025</i>	<i>-4.21</i>
miR_145_5p	<i>&lt;0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>-11.1326</i>	<i>0.02</i>	<i>-6.82</i>
miR_146a_5p	<i>0.001</i>	0.205	-3.99766	<i>0.002</i>	<i>-7.75</i>
miR_26a_5p	<i>&lt;0.001</i>	<i>0.022</i>	<i>-4.18862</i>	<i>0.004</i>	<i>-15.15</i>
miR_150_5p	<i>0.001</i>	0.47	-5.73382	<i>0.001</i>	<i>-28.60</i>
miR_155_5p	<i>0.005</i>	1	-2.72754	<i>0.004</i>	<i>-22.55</i>
miR_15a_5p	0.085				
miR_15b_5p	<i>0.004</i>	0.11		<i>0.065</i>	<i>-6.68</i>
miR_149_3p					
miR_16_5p	<i>0.008</i>	1		<i>0.009</i>	<i>-20.00</i>
miR_17_5p	<i>0.005</i>	1		<i>0.007</i>	<i>-10.30</i>
miR_181a_5p	<i>&lt;0.001</i>	<i>0.024</i>	<i>-4.92669</i>	<i>0.003</i>	<i>-14.70</i>
miR_181b_5p	<i>&lt;0.001</i>	<i>0.012</i>	<i>-7.07596</i>	<i>0.004</i>	<i>-6.68</i>
miR_182_5p	<i>0.002</i>	0.108	-1.74113	<i>0.006</i>	<i>-10.99</i>
miR_27a_3p	<i>0.001</i>	<i>0.013</i>	<i>-5.27275</i>	<i>0.014</i>	<i>-5.76</i>
miR_186_5p	<i>0.003</i>	<i>0.048</i>	<i>-2.02413</i>	<i>0.027</i>	<i>-10.03</i>
miR_18a_5p	<i>0.01</i>	0.885		<i>0.021</i>	<i>-8.72</i>
miR_191_5p	<i>0.002</i>	0.122	-1.60763	<i>0.005</i>	<i>-19.87</i>
miR_192_5p	<i>0.003</i>	<i>0.05</i>	<i>-7.18242</i>	<i>0.021</i>	<i>-5.18</i>
miR_148a_3p	<i>&lt;0.001</i>	<i>&lt;0.001</i>	<i>-74.0857</i>	<i>0.026</i>	<i>-3.98</i>
miR_194_5p	<i>0.01</i>	0.276	-1.97295	<i>0.02</i>	<i>-5.62</i>
miR_195_5p	<i>&lt;0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>-22.8883</i>	<i>0.003</i>	<i>-19.62</i>
miR_196a_5p	<i>0.152</i>				
miR_19a_3p	<i>0.003</i>	0.238	-1.32691	<i>0.007</i>	<i>-9.76</i>
miR_19b_3p	<i>0.001</i>	0.116	-2.36763	<i>0.003</i>	<i>-14.51</i>
miR_200b_3p	<i>0.001</i>	<i>0.004</i>	<i>-6.73932</i>	0.118	-5.34
miR_200c_3p	<i>&lt;0.001</i>	<i>0.001</i>	<i>-25.1103</i>	0.093	-8.44
miR_202_3p					
miR_10a_5p	<i>0.01</i>	<i>0.024</i>	<i>-5.07663</i>	0.227	-2.96
miR_205_5p	<i>0.115</i>				

miR_206					
miR_20a_5p	<b>0.015</b>	1		<b>0.023</b>	<b>-10.97</b>
miR_20b_5p	<b>0.004</b>	0.776		<b>0.009</b>	<b>-8.04</b>
miR_21_5p	<b>0.004</b>	0.158	-2.33306	<b>0.01</b>	<b>-3.58</b>
miR_210_3p	<b>0.052</b>				
miR_214_3p	<b>0.001</b>	<b>0.013</b>	<b>-12.4123</b>	<b>0.011</b>	<b>-8.81</b>
miR_215_5p	<b>0.006</b>	0.107	-6.01519	<b>0.025</b>	<b>-5.43</b>
miR_22_3p	<b>0.023</b>	<b>0.048</b>	<b>-7.09379</b>	0.333	-1.91
miR_221_3p	<b>0.161</b>				
miR_222_3p	<b>0.064</b>				
miR_223_3p	<b>0.002</b>	0.24		<b>0.017</b>	<b>-12.89</b>
miR_23a_3p	<b>0.004</b>	0.168	-1.94819	<b>0.009</b>	<b>-8.84</b>
miR_23b_3p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.013</b>	<b>-4.15095</b>	<b>0.002</b>	<b>-9.52</b>
miR_24_3p	<b>0.001</b>	<b>0.031</b>	<b>-2.90708</b>	<b>0.005</b>	<b>-5.96</b>
miR_25_3p	<b>0.007</b>	1		<b>0.005</b>	<b>-13.55</b>
miR_26b_5p	<b>0.012</b>	1	-1.04132	<b>0.01</b>	<b>-10.73</b>
miR_27b_3p	<b>0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>-12.9222</b>	0.077	-6.49
miR_29a_3p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>-7.20084</b>	0.024	-3.00
miR_29b_3p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.002</b>	<b>-5.29576</b>	0.051	-3.95
miR_29c_3p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>-10.0439</b>	<b>0.018</b>	<b>-3.96</b>
miR_30b_5p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.003</b>	<b>-9.23627</b>	<b>0.008</b>	<b>-13.81</b>
miR_30c_5p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.008</b>	<b>-4.68652</b>	<b>0.005</b>	<b>-15.83</b>
miR_30d_5p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.004</b>	<b>-6.76264</b>	<b>0.002</b>	<b>-13.24</b>
miR_31_5p	<b>0.05</b>	0.741		<b>0.049</b>	
miR_34a_5p	<b>0.007</b>	<b>0.023</b>	<b>-2.75659</b>	0.16	-1.98
miR_423_5p	<b>0.014</b>	0.192	-2.44845	<b>0.042</b>	<b>-7.27</b>
miR_7_5p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>-25.1126</b>	0.128	-2.60
miR_9_5p	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>-14.8621</b>	<b>0.004</b>	<b>-21.01</b>
let_7e_5p	<b>0.005</b>	0.173	-1.84597	<b>0.014</b>	<b>-6.04</b>
miR_92b_3p	<b>0.002</b>	0.058	-4.17145	<b>0.009</b>	<b>-8.46</b>
miR_93_5p	<b>0.011</b>	0.92		<b>0.023</b>	<b>-7.44</b>
miR_99a_5p	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>-58.2561</b>	<b>0.011</b>	<b>-13.68</b>

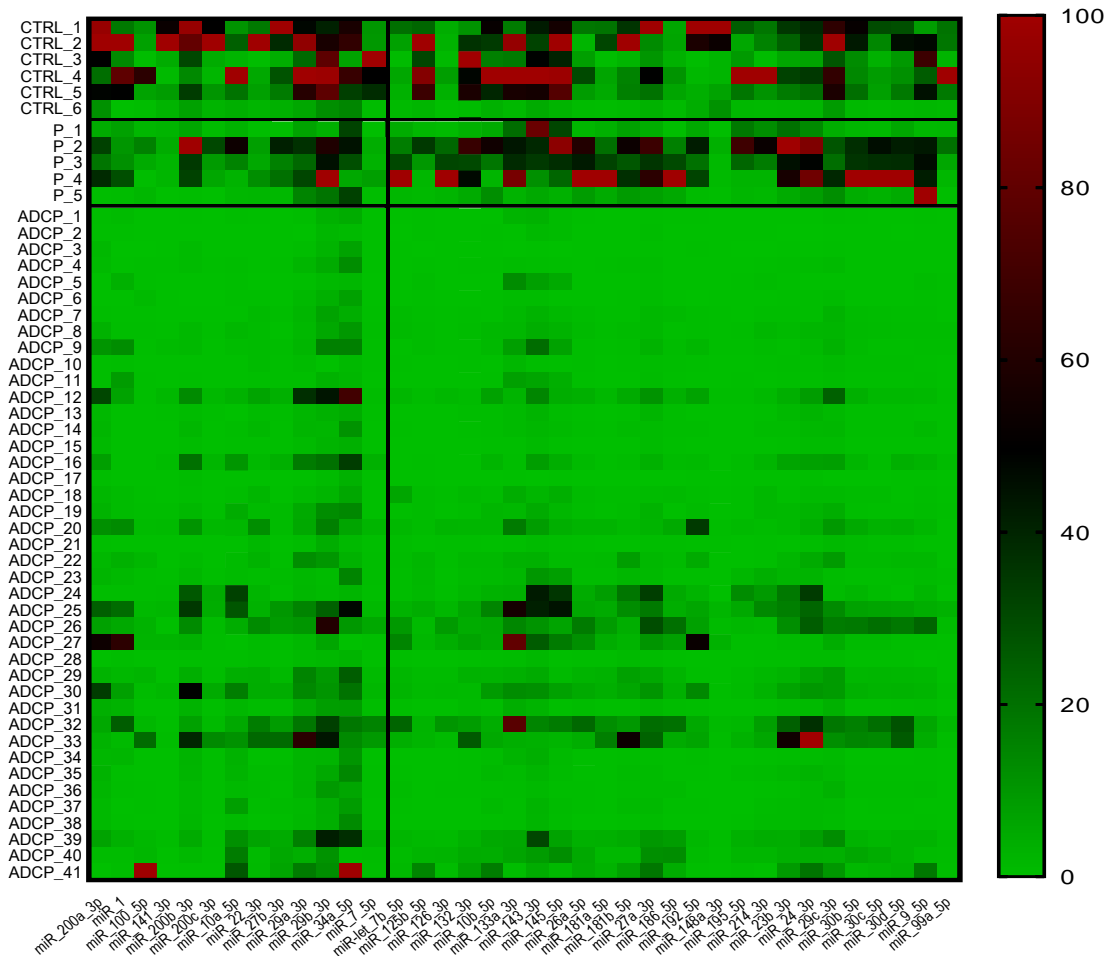


Figura 6. Hartă calorică (heat map). Tiparul de expresie a 38 de miARN (din cele 84 miARN analizate) cu expresie este modificată în ADCP față de lotul control și lotul comparativ, valoare  $p < 0.005$  și  $FR \geq |2|$ . Heat map indică supraexpresia (ROȘU), subexpresia (VERDE) și expresia medie (NEGRU). Datele au fost distribuite scalar considerând cea mai mare valoare drept 100% și cea mai mică valoare 0%. Rândurile reprezintă probele individuale tisulare, coloanele reprezintă simbolurile miARN.

Analiza pair-wise comparativă a demonstrat subexpresia a 25 de miARN în lotul de studiu față de lotul control și lotul comparativ. Cele mai puternic subexprimate miARN în lotul de studiu au fost: miR-148a, miR-99a, miR-125b, miR-132, miR-195 (ordonate descrescător corespunzător FR).

La analiza pair-wise comparativă am determinat 13 miARN ce au prezentat expresie scăzută în lotul de studiu comparativ cu lotul control, dar nu și cu lotul comparativ. miR-141, miR-200c, miR-7 sunt cele mai puternic subexprimate miARN în acest caz, conform FR.

Malnutriția rămâne un factor de prognostic nefavorabil în evoluția pacienților cu ADCP. În studiul nostru am decelat diferențe semnificative statistic între nivelul miR-143, miR-29b, miR-34b și miR-99a în rândul pacienților malnutriți. Am observat că pacienții cu IMC sub  $18.5\text{kg/m}^2$  prezintă niveluri mai mici ale miR-143 ( $p=0.034$ ), miR-29b ( $p=0.036$ ), miR-34a ( $p=0.023$ ), respectiv ale miR-99a ( $p=0.020$ ) (Figura 7).

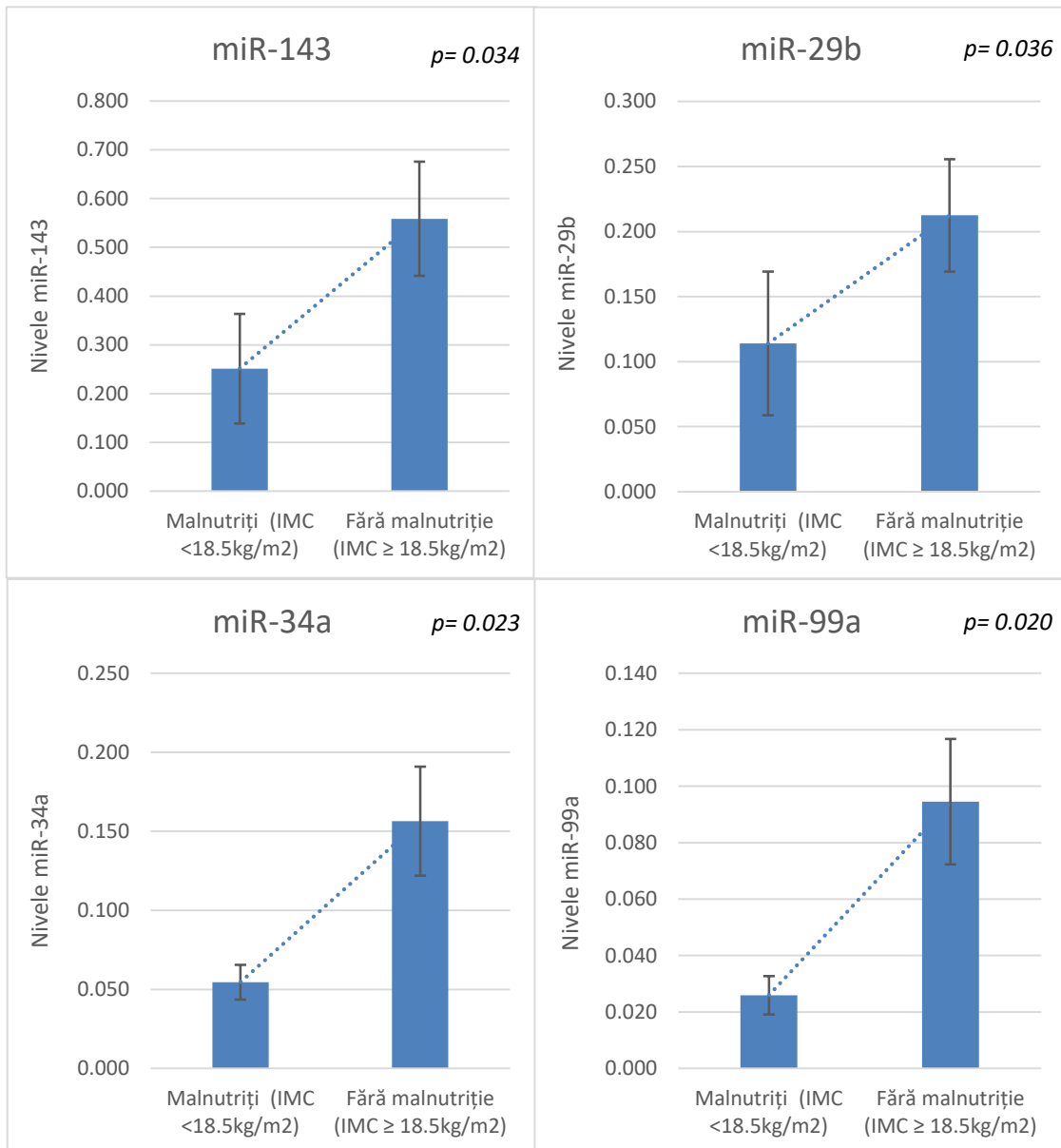


Figura 7. Diferențele semnificative statistic între expresia miR-29b, miR-34a, miR-99a și miR-143 în funcție de prezența malnutriției (IMC  $\geq 18.5\text{kg/m}^2$ )

La analiza Mann-Withney am observat că prezența durerii (care ar dovedi forma mai avansată de boală) asociază niveluri mai mici ale miR-1 ( $p=0.003$ ), miR-100



( $p=0.046$ ), miR-126 ( $p=0.023$ ), miR-133 ( $p=0.005$ ), miR-143 ( $p=0.026$ ), miR-145 ( $p=0.028$ ) și let-7 ( $p=0.042$ ).

S-a dovedit existența unui trend de semnificație statistică între valorile scăzute ale miR-100 și dimensiunea crescută a tumorii ( $p=0.060$  la analiza Kruskal-Wallis).

Invazia vasculară reprezintă un marker de progostic negativ, iar la analiza profilului miARN am observat că există diferențe semnificative statistic între nivelurile miR-10a în rândul pacienților cu invazie vasculară, respectiv fără invazie vasculară ( $p=0.028$ ). Așadar pacienții cu invazie vasculară au niveluri mai mici ale miR-10a (Figura 8).

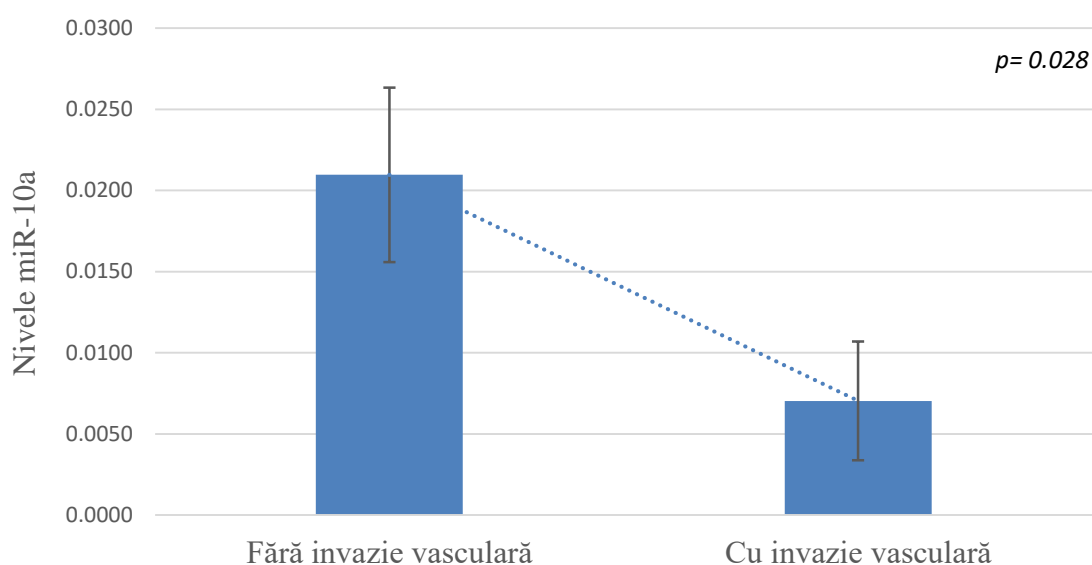


Figura 8. Diferențele semnificative ale miR-10a în rândul pacienților cu și fără invazie vasculară

Tredline negativ de semnificație statistică s-a observat în expresia miR-192 în rândul pacienților cu sau fără metastaze ( $p=0.065$ ). Pacienții cu metastaze prezintă niveluri mai mici ale miR-192, acesta putând fi evaluat pe loturi mai mari de pacienți pentru a observa dacă va căpăta rol prognostic.

Cercetând căile de semnalizare implicate în funcționarea miARN prin metode bioinformatică (DIANA TarBase), am identificat implicarea căilor de semnalizare ale insulinei, IGF/IGF-1R în progresia ADCP. Din cercetarea noastră putem menționa 6 miARN (miR-1, miR-100, miR-9, miR-145, miR-29c și miR-195) implicate în calea IGF/IGF-1R, subexprimate în lotul de studiu față de lotul control și lotul comparativ. Mai mult, există diferențe de expresie a 9 miARN implicate în calea IGF/IGF-1R față de lotul control, ce prezintă expresie scăzută în ADCP: let-7b-5p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-145-5p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-195-5p, miR-29c-3p și miR-9-5p.

La analiza lotului de studiu am observat că există miARN crescute doar în lotul de pancreatita cronică comparativ cu lotul control. miR-103a-30, miR-106a,b-5p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-18a, miR-20a,b-5p, miR-223-3p, miR-93-5p sunt supraexprimate, prezentând FR de până la 73.88. Acestea pot prezenta un rol important în căile inflamatorii. Mai multe studii ce ar certifica rolurile miARN în mecanismele inflamatorii din pancreatita cronică pot ajuta în determinarea unor ținte terapeutice pentru tratamentul acestei patologii.

Există limitări ale studiului nostru. Întrucât cohorta de studiu, lotul control și lotul comparativ includ un număr mic de pacienți, noi studii urmărind miARN deja regăsite în cercetarea de față ca subexprimate ar fi utile, realizate pe loturi mai mari de pacienți pentru a întări veridicitatea datelor obținute. Întrucât informațiile obținute pentru diagnosticul de pancreatită cronică sunt limitate din cauza prelevării prin FNA, urmărirea pacienților din lotul comparativ de pancreatita cronică a fost esențială pentru confirmarea diagnosticului. Studiile din literatura de specialitate demonstrează că FNB sau biopsia chirurgicală oferă rezultate mai bune din punct de vedere al celularității în pancreatita cronică. O altă limitare a studiului constă în lipsa analizelor histopatologice a probelor direcționate examinării miARN, însă pentru acest impediment am realizat analiza calitativă a țesutului adus și ulterior am identificat oulieri în studiu cu ajutorul bioinformaticii și analizei statistice.

Concluziile au fost definitive în **Capitolul 8**. Supraviețuirea în adenocarcinomul pancreatic rămâne mică din cauza prezentării la medic în forme avansate de boală. Descoperirea unor markeri biologici de predicție este esențială în tratamentul optim al bolii.

Identificarea factorilor de risc implicați în etiopatogeneza adenocarcinomului pancreatic ar ajuta în diagnosticul precoce al bolii și facilita prezentarea precoce a pacienților la medic, îmbunătățind prognosticul.

Întrucât vârsta înaintată rămâne un factor de risc important în adenocarcinomul pancreatic, scăzând supraviețuirea, evaluarea corespunzătoare a semnelor de alarmă din acest grup populațional este esențială pentru detecția bolii în forme mai puțin avansate.

Accesibilitatea scăzută la resursele medicale trebuie adresată în rândul pacienților din zonele rurale, întrucât incidența adenocarcinomului pancreatic este mai mare pentru pacienții din mediul urban doar datorită facilității crescute de a efectua investigațiile necesare punerii diagnosticului.

Apariția diabetului zaharat la un pacient normoponderal adult poate impune necesitatea investigațiilor suplimentare îndeosebi dacă pacientul prezintă și alți factori de risc pentru adenocarcinom pancreatic. Mai mult, recoltarea HbA1C ca marker biologic poate fi luată în considerare în alcătuirea unor formule de diagnostic precoce în adenocarcinomul pancreatic.

Ecoendoscopia a devenit o examinare de bază în patologia pancreatică oferind o gamă vastă de informații cu accesibilitate mai mare decât în trecut. Așadar diagnosticul pacienților cu leziuni pancreatice a devenit mai facil prin intermediul elastografiei, funcției Doppler color, folosirii substanțelor de contrast în caracterizarea leziunilor și mai ales a biopsiei (EUS-FNA sau EUS-FNB). Ecoendoscopia combinată cu punțiile aspirative și biopsiile ecoendoscopice ghidate reprezintă proceduri minim invazive cu riscuri mult reduse față de investigațiile anterior folosite (punții percutane ecoghidate sau punții intraoperatorii). Ecoendoscopia prezintă sensibilitate și specificitate mai mari decât examinarea CT în diagnosticul și caracterizarea în detaliu a tumorilor sub 3cm, implicată astfel în detecția precoce a ADCP.

miARN fac parte din biomarkerii de mare importanță în pancreatologie, din ce în ce mai multe studii urmărind expresia lor în tumorigeneză fie ca oncomiR prin supraexpresie sau ca supresor tumoral prin subexpresie.

#### **Contribuțiile personale** în cercetarea noastră au fost următoarele:

1. Rolul ecoendoscopiei în diagnosticul precoce și prognosticul adenocarcinomului pancreatic derivă din posibilitatea prelevării țesutului tumoral prin FNA sau FNB și ulterior a analizei moleculare a probelor recoltate. Consecutiv acestei analize putem determina markeri de diagnostic precoce sau prognostic nefavorabil implicați în adenocarcinomul pancreatic.

2. Vârsta medie a pacienților din studiu a fost de  $66.21 \pm 10.12$  ani, doar 11.62% din lot având vârsta sub 55 ani. S-a observat prezența unei corelații semnificative statistice între vârsta înaintată și supraviețuirea scăzută.

3. Dintre factorii de risc implicați în apariția ADCP regăsim în lotul de studiu factori ce pot fi modificați: fumatul (16.7%), consumul de alcool (16.27%) și expunerea la substanțe nocive (19.2%); respectiv ce nu pot fi modificați: vârsta înaintată, prezența altor comorbidități precum diabetul zaharat (44.2%), antecedentele heredocolaterale de ADCP (9.5%).

4. 82.9% din pacienți prezintă glicemie bazală modificată sau diabet zaharat, punând în evidență importanța urmăririi mai amănunțite a pacienților cu diabet zaharat.

5. Durerea în etajul abdominal superior rămâne principalul simptom în adenocarcinomul pancreatic, întâlnit la majoritatea pacienților din lot (88%).

6. O treime din pacienți sunt subponderali (IMC <18.5 kg/m<sup>2</sup>), demonstrând impactul adenocarcinomului pancreatic asupra statusului nutrițional.

7. 60.5% din lot prezintă localizare cefalopancreatică a tumorii. Întrucât acești pacienți prezintă simptome mai repede decât cei cu localizare corporeo-caudală prin compresia căii biliare principale, se observă asocierea valorilor mai mari ale markerilor de coleastăz (BR totală și directă, GGT) și hepatocitoliză (ALT, AST) cu localizarea cefalică pancreatică.

8. 90.69% din pacienții din studiu prezintă forme inoperabile, nici un pacient nu este în formă rezecabilă, iar doar 9.31% din lot sunt borderline rezecabili.

9. Supraviețuirea este negativ corelată cu statusul avansat ECOG, dimensiunea crescută a tumorii și existența metastazelor, așadar detecția precoce a leziunilor rămâne un obiectiv în cercetarea adenocarcinomului pancreatic.

10. Ecoendoscopia a oferit informații esențiale prin prelevarea de biopsii și analiza moleculară, punând bazele întregii cercetări. Studiul nostru confirmă cercetările de specialitate și arată că miARN tisular este exprimat diferit în adenocarcinomul pancreatic comparativ cu țesutul pancreatic sănătos și cu pancreatita cronică. Așadar din lotul din primul studiu de 43 de pacienți, cohorta considerată pentru examinarea expresiei miARN a fost alcătuită din 41 de pacienți, 6 pacienți au alcătuit lotul control (țesut pancreatic normal peritumoral) și 5 pacienți au constituit lotul comparativ (pancreatita cronică). Semnătura miARN a adenocarcinomului pancreatic în cadrul cercetării noastre a urmărit expresia a 84 de miARN, decelând 75 miARN diferit exprimate între cele 3 loturi.

11. La analiza comparativă s-a observat subexpresia a 25 de miARN în ADCP față de lotul control și lotul comparativ, respectiv 13 miARN subexprimate în ADCP față de lotul control.

12. Deși există studii limitate, predominant pe linii celulare sau modele animale, în cercetarea noastră am identificat subexpresia miR-1, miR-133, miR-143, miR-195 și miR-22 tisulare în adenocarcinomul pancreatic, completând datele din literatură.

13. Subexpresia miR-10b, miR-125b, miR-145, miR-24 și miR-27b este regăsită în lotul de studiu, însă există divergențe în literatură referitor la expresia acestor miARN.

14. Malnutriția scade supraviețuirea și calitatea vieții, fiind un marker de prognostic al evoluției nefavorabile. Există diferențe ale expresiei (expresie scăzută) miR-143, miR-29b, miR-34a și miR-99a în rândul pacienților cu IMC sub 18.5kg/m<sup>2</sup> în lotul de studiu.

15. Dimensiunea crescută a tumorii este un factor de prognostic negativ în ADCP, iar studiul de față demonstrează existența unui trend de semnificație statistică între dimensiunile mari ale tumorii și subexpresia miR-100.

16. În rândul pacienților cu invazie vasculară am observat valori mai mici ale miR-10a, fiind luat în considerare ca marker de prognostic negativ.

17. Date suplimentare sunt necesare pe loturi mai mari de pacienți însă cercetarea noastră arată o tendință de diferențiere statistică a valorilor miR-192 în rândul pacienților cu metastaze, comparativ cu pacienții ce nu prezintă determinări secundare.

18. La analiza bioinformatică (DIANA TarBase) am determinat rolul căii de semnalizare a insulinei și IGF-1R în progresia ADCP. 6 miARN implicate în calea IGF/IGF-1R sunt subexprimate în ADCP spre deosebire de lotul control și lotul comparativ. Alte 9 miARN au expresie scăzută în ADCP comparativ cu lotul control.

**Direcțiile viitoare de studiu** în domeniul biomarkerilor miARN din ADCP au fost descrise în ultimul subcapitol. Definirea unor biomarkeri pentru patologia benignă pancreatică cu risc de transformare malignă ar ajuta în punerea bazelor medicinei preventive în ADCP. Expresia miARN diferențiat exprimată în leziunile pancreatice benigne față de leziunile maligne este importantă în tratamentul preventiv. Subexpresia miR-214 și miR-148 obținută prin metoda ecoendoscopică apare în adenocarcinomul pancreatic comparativ cu leziunile benigne pancreatice conform studiilor, derivând astfel rolul de diagnostic precoce al acestor markeri.

miARN circulante rămân ținta cea mai atractivă prin abundența, stabilitatea și ușurința procurării probei.

Inițial utilizate cu rol de biomarker și rol prognostic, miARN încep a fi studiate pentru rolul lor terapeutic prin controlul expresiei miARN. Așadar noi studii sunt necesare pentru a ținti nu doar miARN, cât și moleculele țintă ale acestora, fiind un pas important în tratamentul personalizat al adenocarcinomului pancreatic. MAP4K4 reprezintă țintă moleculară a miR-141 și poate fi o genă luată în considerare pentru un nou tratament personalizat în adenocarcinomul pancreatic.

Tratamentul personalizat în adenocarcinomul pancreatic poate ținti miARN pentru a crește sensibilitatea la chimioterapie în cazul moleculelor implicate în creșterea

rezistenței la tratament chimioterapeutic, respectiv la radioterapie (subexpresia miR-23b fiind corelată cu radiorezistența).

Pași suplimentari sunt în desfășurare pentru a dezvolta markeri mai accesibili pentru detecția moleculelor implicate în apariția adenocarcinomului pancreatic. Așadar examinarea imunohistochimică poate fi luată în considerare pentru detecția ADAM9, implicată în axa miR-126/ADAM9. Deși nivelul de expresie al E-cadherinei poate fi identificat imunohistochimic, anticorpul specific va avea valori mult prea mici comparativ cu nivelurile miARN circulante sau tisulare.

## LISTA LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Articole publicate în reviste de specialitate

- Articole ISI

- Dobre M, Herlea V, **Vlăduț C**©, Ciocîrlan M, Balaban VD, Constantinescu G, Diculescu M, Milanesi E. Dysregulation of miRNAs targeting the IGF-1R pathway în pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cells* 2021, 10(8), 1856. DOI: 10.3390/cells10081856.  
<https://www.mdpi.com/2073-4409/10/8/1856>
- Ciocîrlan M, Gheorghiu A, Bilous D, Cruceru M, Mănăila, Tianu E, **Vlăduț C**. Connect your needle to a smartphone to increase EUS FNA sample quality and diagnostic accuracy of solid pancreatic masses: a randomized trial. *Endoscopy* 2021; eFirst 2021 May. PMID: 33940637; DOI 10.1055/a-1497-6532.  
<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/a-1497-6532>.
- **Vladut C**, Ciocirlan M, Bilous D, Sandru V, Stan-Ilie M, Panic N, Becheanu G, Jinga M, Costache RS, Costache DO, Diculescu M. “*An Overview on Primary Sclerosing Cholangitis*”. *Journal of Clinical Medicine* 2020; 9, 754: 1-16.  
<https://www.mdpi.com/2077-0383/9/3/754>.
- **Vladut C**, Ciocirlan M, Costache RS, Jinga M, Balaban VD, Costache DO, Diculescu M. “*Is mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma an infectious disease? Role of Helicobacter pylori and eradication antibiotic therapy (Review)*”. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2020; 20: 3546-3553.  
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.9031>
- **Diaconu C**, Ciocîrlan M, Ilie M, Sandru V, Balaban DV, Plotogea O, Diculescu M. “*Gurvitis syndrome: the dark shade of hematemesis*”. *Endoscopy* 2019; DOI: 10.1055/a-1059-9268.  
<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/a-1059-9268>
- **Diaconu C**, Ciocîrlan M, Jinga M, Costache RS, Constantinescu G, Ilie M, Diculescu M. “*Ectopic pancreas mimicking gastrointestinal stromal tumor în the stomach fundus*”. *Endoscopy* 2018; 50(07): E186-E187. DOI: 10.1055/a-0605-2996.  
<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/a-0605-2996>

Lucrări prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale naționale și internaționale:

- Rinja E, Plotogea O, Sandru V, **Vladut C**, Ilie M. “*Endoscopic ultrasound with ‘bite’ fine needle biopsy in a patient with pancreatic cyst*”. ESGE Days 2020 ePoster presentation. April 2020. DOI: 10.1055/s-0040-1705026.
- Plotogea O, ilie M, Sandru V, **Diaconu C**, Ilie M, Constantinescu G. “*Endoscopic ultrasonography with fine needle aspiration in the diagnosis of pancreatic tumors – retrospective, unicentric study*”. National Conference of Gastroenterology, Hepatology and Endoscopy 2019. XXXIX edition, Bucharest 6-8<sup>th</sup> June 2019
- Sandru V, Ilie M, Plotogea OM, **Diaconu C**, Ungureanu B, Rosianu C, Constantinescu G. „*Are plastic stents expandable in the treatment of biliary strictures after orthotopic liver transplantation?*” UEGW Vienna 2018.



## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Michl, Patrick, și alții. UEG position paper on pancreatic cancer. Bringing pancreatic cancer to the 21st century: prevent, detect, and treat the disease earlier and better. *UEG journal*. 9 (7), 2021, pg. 860-871.
2. Aslanian, Harry R, Lee, Jeffrey H și Canto, Marcia Irene. AGA CLinical Practice Update on Pancreas Cancer Screening High-Risk Individuals: Expert Review. *Gastroenterology*. 2020, Vol. 159, pg. 358-62.
3. Modi, Bijal și Shires, Thomas G. Pancreatic cancer, cystic pancreatic neoplasms and other nonendocrine pancreatic tumors. [autorul cărții] Mark Feldman, și alții. *Gastrointestinal and liver disease*. 11th. Philadelphia : Elsevier, 2020, Vol. 1, 60, pg. 1130-1180.
4. Wolpin, Brian M, și alții. ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer. *Journal Natl Cancer Inst*. Martie 2009, Vol. 101 (6), pg. 424-431.
5. Fanta, Paul T și Lowy, Andrew M. Adenocarcinoma of the pancreas. [autorul cărții] Daniel K Podolsky, și alții. *Yamada's Textbook of Gastroenterology*. Sixth. s.l. : Wiley Blackwell, 2016, 87, pg. 1761-1781.
6. www.uptodate.com. [Interactiv]
7. Stoffel, Elena M, și alții. Evaluating Susceptibility to Pancreatic Cancer: ASCO Provisional Clinical Opinion. *Journal of Clinical Oncology*. 2018, Vol. 37, 2, pg. 153-164.
8. Canto, Marcia Irene, și alții. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk of familial pancreatic cancer. *GUT*. 2013, Vol. 62, pg. 339-347.
9. Kim, Joo Y și Hong, Seung-Mo. Precursor Lesions of Pancreatic Cancer. *Oncology Research and Treatment*. 2018, Vol. 41, pg. 603-610. DOI: 10.1159/000493554.
10. Baradaran, Behzad, Shahbazi, Roya și Khordadmehr, Monireh. Dysregulation of key microRNAs in pancreatic cancer development. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019, Vol. 109, pg. 1008-1015. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.177.

11. Hosein, N Abdel, Brekken, Rolf A și Maitra, Anirban. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2020, Vol. 17, pg. 487-505. DOI: 10.1038/s41575-020-0300-1.
12. Tesfaye, Anteneh A, Azmi, Asfar S și Philip, Philip A. miRNA and Gene Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*. 2019, Vol. 189 (1), pg. 58-70. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.10.005.
13. Słotwiński, Robert, Lech, Gustaw și Małgorzata Słotwińska, Sylwia. MicroRNAs in pancreatic cancer diagnosis and therapy. *Central European Journal of Immunology*. 2018, Vol. 43 (3), pg. 314-324.
14. Gheorghe, Gina, și alții. Early Diagnosis of Pancreatic Cancer: The Key for Survival. *Diagnostics*. 2020, Vol. 10 (869), pg. 1-17. DOI:10.3390/diagnostics10110869.
15. Malhotra, Lavina, Ahn, Daniel H și Bloomston, Mark. The Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Pancreatic Cancer. *Journal of Gastrointestinal and Digestive System*. 2015, Vol. 5 (2), pg. 1-11. DOI: 10.4172/2161-069X.1000278.
16. Ven Fong, Zhi și Ferrone, Cristina R. Surgery After Response to Chemotherapy for Locally Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: a guide for management. *Journal of National Comprehensive Cancer Network*. 2021, Vol. 19 (4), pg. 459-467.
17. Tzeng, CW, și alții. Defined clinical classifications are asociated with outcome of patients with anatomically resectable pancreatic adenocarcinoma treated with neoadjuvant therapy. *Ann Surg Oncol*. 2012, Vol. 19 (6), pg. 2045-2053.
18. Bockhorn, Maximilian, și alții. Borderline resectable pancreatic cancer: A consensus statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*. 2014, Vol. 155 (6), pg. 977-988. DOI: 10.1016/j.surg.2014.02.001..
19. *www.nccn.org*. [Interactiv] [Citat: 3 September 2020.] <https://www.nccn.org/>.
20. Isaji, Shuji, și alții. International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology*. 2017, pg. 1-10.

21. Wang, Wei, și alții. Use of EUS-FNA in diagnosing pancreatic neoplasm without a definite mass on CT. *Clinical Endoscopy*. 2013, Vol. 72 (1), pg. 73-80. DOI: 10.1016/j.gie.2013.01.040.
22. Dumonceau, Jean-Marc, și alții. Indications, results and clinical impact of endoscopic ultrasound (EUS)-guided sampling in gastroenterology: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline - Updated January 2017. *Endoscopy*. 2017, Vol. 49 (7), pg. 695-714. DOI: 10.1055/s-0043-109021.
23. Zhang, Lulu, Sanagapalli, Santosh și Stoita, Alina. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. 2018. Vol. 24 (19), pg. 2047-2060.
24. Chen, Bo, și alții. Papanicolaou Society of Cytopathology new guidelines have a greater ability of risk stratification for pancreatic endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens. *Oncotarget*. 2017, Vol. 8, pg. 8154-8161. DOI: 10.18632/oncotarget.14105.
25. Ducreux, M, și alții. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015, Vol. 26 (Supplement 5), pg. v56-v68. DOI: 10.1093/annonc/mdv295.
26. Sohal, Davendra P.S., și alții. Metastatic Pancreatic Cancer: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*. 38 (27), pg. 3217-3230.
27. Qi, Zi-Hao, și alții. The significance of liquid biopsy in pancreatic cancer. *Journal of Cancer*. 9 (18), 2018, pg. 3417-3426.