

## Resumo

Este artigo de revisão teve como principais objetivos resumir e avaliar os exames imagiológicos e os biomarcadores que atualmente são utilizados para a detecção precoce do adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), e enunciar os biomarcadores que têm vindo a ser alvo de estudos promissores no campo do diagnóstico precoce, nomeadamente os marcadores genéticos, proteicos, metabólicos, epigenéticos e as células tumorais circulantes.

Para este fim foram utilizadas as bases de dados bibliográficas Tripdatabase e PubMed/MEDLINE, tendo-se analisado as publicações dos últimos dez anos relativas aos exames imagiológicos e aos marcadores biológicos usados no diagnóstico precoce do ADP.

Verificou-se que os métodos de diagnóstico hoje utilizados na prática clínica para detetar o adenocarcinoma ductal pancreático se baseiam na imagiologia e no biomarcador sérico antigénio dos hidratos de carbono (do inglês CA – *carbohydrate antigen*) 19-9, não tendo estes, todavia, sensibilidade e especificidade elevadas para permitirem o diagnóstico do ADP em estadios precoces. Verificou-se também que há biomarcadores genéticos, proteicos, metabólicos, epigenéticos e células tumorais circulantes que têm sido objeto de investigação, vindo a demonstrar resultados atrativos no que respeita à detecção de lesões neoplásicas em estadios iniciais, com valores de sensibilidade e de especificidade superiores aos do CA19-9 e aos da imagiologia.

Todavia, apesar da descoberta de novos biomarcadores de diagnóstico e de estudos com resultados animadores, falta ainda validar e certificar esses biomarcadores, para que possam vir a ter aplicabilidade clínica.

**Palavras-Chave:** neoplasias pancreáticas; diagnóstico precoce; adenocarcinoma; marcadores biológicos; imagiologia; genómica; epigenómica.

## **Abstract**

The main objectives of this review were to summarize and evaluate the imaging tests and biomarkers that have currently been used for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma and to refer new biomarkers that have been the subject of promising studies for early diagnosis, including genetic, protein, metabolic and epigenetic markers and still the circulating tumor cells.

We used the bibliographic databases Tripdatabase and PubMed/MEDLINE and we analyzed the publications of the last ten years relating to biological markers and imaging tests useful for early diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma,

It was found that diagnostic methods currently used in clinical practice to detect pancreatic ductal adenocarcinoma are based on imaging and on serum carbohydrate antigen (CA) 19-9, but they do not show sensitivity and specificity to diagnose the pancreatic ductal adenocarcinoma in early stages. It was also noted that there are genetic, protein, metabolic and epigenetic biomarkers and circulating tumor cells that have been the subject of several studies which have shown attractive results for the detection of neoplastic lesions in the early stages, with sensitivity and specificity values higher than CA19-9 and imaging.

In conclusion, despite the discovery of new biomarkers and the diagnostic studies with encouraging results, subsequent validation and verification of these biomarkers are still lacking in order that they be clinically useful.

**Keywords:** pancreatic neoplasms; early diagnosis; adenocarcinoma; biological markers; diagnostic imaging; genomics; epigenomics.

## **Introdução**

O cancro do pâncreas é o 13º cancro mais diagnosticado em todo o mundo e a oitava principal causa de morte por cancro. Apesar de ser uma doença rara, é uma das formas mais letais de cancro. Segundo a base de dados da Organização Mundial de Saúde sobre a mortalidade na União Europeia, em 2009 observaram-se 74123 casos de morte por cancro do pâncreas, o que correspondeu a uma taxa de 6,6 mortes por 100000 mortes certificadas na União Europeia<sup>1</sup>. Prevê-se que em 2015, na União Europeia, este número suba para cerca de 85300 casos de morte por cancro do pâncreas, o que corresponderá a uma taxa de 6,9 mortes por 100000 mortes certificadas na União Europeia<sup>1</sup>.

Há vários tipos de cancro do pâncreas, sendo o adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) o mais comum, correspondendo a mais de 90% de todos os casos de cancro do pâncreas. Tem uma taxa de sobrevivência aos 5 anos após o diagnóstico de apenas 5% e a maioria dos doentes sobrevive menos do que 1 a 2 anos. O mau prognóstico desta neoplasia resulta de vários fatores: a natureza silenciosa da doença que leva ao diagnóstico tardio, o elevado potencial metastático e a resistência à quimioterapia e radioterapia convencionais. Apesar das inúmeras pesquisas que têm sido feitas nas últimas décadas, o avanço no diagnóstico e tratamento desta doença continua a ser muito lento<sup>2-4</sup>.

Até ao momento, a única opção com hipóteses curativas é a resseção cirúrgica, mas ela só é viável se os doentes forem diagnosticados em estadios precoces, o que ocorre apenas em 15% dos doentes com ADP. Nestes doentes há efetivamente uma hipótese real de cura, todavia mesmo nestes a taxa de sobrevivência aos 5 anos é de apenas 20 a 30%<sup>2-4</sup>.

Os restantes 85% apresentam doença avançada no momento do diagnóstico. Nestes, restam as terapias paliativas, como a quimioterapia e a radioterapia, mas estas não conferem um grande aumento na sua sobrevida<sup>2-4</sup>.

A variedade de testes de diagnóstico por imagem disponíveis inclui a ecografia abdominal, a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM), a ecoendoscopia, a colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE) e a colangiopancreatografia por ressonância magnética (CPRM). Normalmente, de acordo com “guidelines” internacionais, aplicam-se combinações de modalidades de imagem diferentes no diagnóstico pré-operatório e no estadiamento dos doentes com suspeita de carcinoma pancreático, pois não há nenhum método que isoladamente proporcione sensibilidade e especificidade suficientes. Mesmo assim, a capacidade dos exames imagiológicos para detetarem lesões neoplásicas em estadios precoces ou para diferenciarem a pancreatite crônica do ADP está abaixo do ideal<sup>2,5</sup>.

As limitações óbvias dos métodos de diagnóstico convencionais na detecção e classificação das lesões pancreáticas, especialmente as mais pequenas, facilitaram a pesquisa de novas estratégias de diagnóstico mais eficientes para identificação dos doentes com ADP. Nesse sentido, surgiram os biomarcadores baseados em alterações genómicas, proteómicas, metabolómicas e epigenómicas, detetáveis no soro, plasma, urina, fezes, tecido ou suco pancreáticos<sup>5</sup>.

O número de biomarcadores implicados no diagnóstico do ADP é realmente impressionante, havendo mais de 2500 candidatos a serem propostos na literatura recente. No entanto, a grande maioria deles permanece na fase experimental<sup>6</sup>.

Este artigo de revisão tem como objetivo resumir os exames imagiológicos e os biomarcadores que hoje são utilizados na detecção precoce do ADP. Também pretende abordar os novos biomarcadores objeto de estudos promissores no campo do diagnóstico precoce.

## **Materiais e Métodos**

A metodologia aplicada consistiu numa pesquisa nas bases de dados bibliográficas Tripdatabase e PubMed/MEDLINE usando como limites os anos de 2004 a 2014. A pesquisa foi restringida a artigos em inglês e português e relativos a humanos. Inicialmente pesquisei apenas artigos de revisão, selecionando dentro destes as referências bibliográficas relacionadas com os métodos de diagnóstico precoce do ADP. Posteriormente, utilizando a PubMed/MEDLINE, e tendo como limites os anos de 2010 a 2014, estudos em humanos e nas línguas portuguesa e inglesa, pesquisei meta-análises, artigos de investigação e artigos científicos. As palavras-chave utilizadas em ambas as pesquisas seguiram o Medical Subject Headings (MeSH) – “Pancreatic neoplasms/diagnosis” [MeSH Terms] AND “Adenocarcinoma/diagnosis” [MeSH Terms]; “Pancreatic Neoplasms/diagnosis/biological markers” [MeSH Terms] AND “Adenocarcinoma/diagnosis/biological markers” [MeSH Terms]; “Pancreatic neoplasms/early diagnosis” [MeSH Terms] AND “Adenocarcinoma/early diagnosis” [MeSH Terms].

## **Evolução e Progressão do ADP**

Embora o sistema ductal compreenda uma pequena porção do pâncreas exócrino, mais de 90% das neoplasias pancreáticas são de origem ductal, das quais 80% são adenocarcinomas invasivos. Existem também neoplasias pancreáticas neuroendócrinas, mas estas constituem menos de 5% de todas as neoplasias pancreáticas. Neste artigo apenas iremos abordar o adenocarcinoma ductal pancreático<sup>7,8</sup>.

A origem das células neoplásicas no adenocarcinoma ductal ainda não é clara, embora várias hipóteses já tenham sido propostas, como o epitélio não-neoplásico ductal, as células dos ilhéus pancreáticos e, mais recentemente, as células estaminais pancreáticas<sup>8,9</sup>.

Pensa-se que a transformação das células não neoplásicas pancreáticas em adenocarcinoma invasivo ocorra através de uma série de lesões pré-malignas, que vão progressivamente adquirindo mutações genéticas e alterações epigenéticas durante o processo de carcinogénese. Estas lesões precursoras (Tabela I) são na sua maioria neoplasias intraepiteliais pancreáticas (do inglês PanIN – *pancreatic intraepithelial neoplasia*). As PanINs subdividem-se em PanIN-1a (lisa), PanIN-1b (papilar sem displasia), PanIN-2 (papilar com alterações displásicas) e PanIN-3 (carcinoma in situ). Têm sido propostos modelos de evolução tumoral em que as células epiteliais pancreáticas normais vão acumulando mutações genéticas, levando aos vários graus de PanIN e finalmente ao adenocarcinoma invasivo. Embora estes modelos de evolução não sejam definitivos, a PanIN e a doença invasiva são ambas frequentemente encontradas em tecido ressecado e ambas apresentam mutações genéticas semelhantes<sup>8,9</sup>.

Para além das lesões PanINs, existem as neoplasias mucinosas-papilares intraductais (do inglês IPMN – *intraductal papillary mucinous neoplasm*) que são neoplasias produtoras de mucina que se manifestam por uma grande dilatação dos ductos intra-pancreáticos, que envolvem todo o sistema de ductos ou estão restritas ao ducto pancreático principal ou aos seus ramos. As IPMNs são classificadas histologicamente em subtipos gástricos (atipia epitelial leve), intestinais (atipia epitelial moderada a severa), pancreatobiliares (atipia epitelial severa) e oncocíticos (atipia epitelial severa), sendo estes dois últimos subtipos raros. As IPMNs do tipo intestinal são geralmente encontradas no ducto pancreático principal e têm propensão para se transformarem em carcinoma mucinoso não-cístico (colóide), enquanto as IPMNs que estão nos ramos acessórios são geralmente do tipo gástrico e são normalmente benignas. As IPMNs pancreatobiliares têm um risco mais elevado de progredirem para ADP. Apesar desta classificação, muitas vezes as IPMNs são constituídas por mais do que um subtipo histológico<sup>8,10</sup>.

Por fim, temos as neoplasias císticas mucinosas (do inglês MCN – *mucinous cystic neoplasm*), distinguindo-se das IPMNs pela ausência de comunicação entre o quisto e o ducto pancreático adjacente. As MCNS caracterizam-se pela presença de estroma do tipo ovárico e classificam-se histologicamente em cistadenoma mucinoso, cistadenoma mucinoso com displasia moderada (“borderline”) e cistadenocarcinoma mucinoso não invasivo (carcinoma in situ). Todas as MCNs são consideradas geralmente como potencialmente malignas, devido ao risco associado de cistadenocarcinoma mucinoso invasivo<sup>8</sup>.

As estratégias focalizadas na identificação de biomarcadores que sejam específicos para as PanINs, IPMNs ou MCNs podem vir a representar no futuro estratégias dirigidas ao rastreio do cancro do pâncreas<sup>3</sup>. Contudo, o grande problema será sempre saber como identificar os grupos de risco, uma vez que estes doentes, numa fase inicial, são quase sempre assintomáticos.

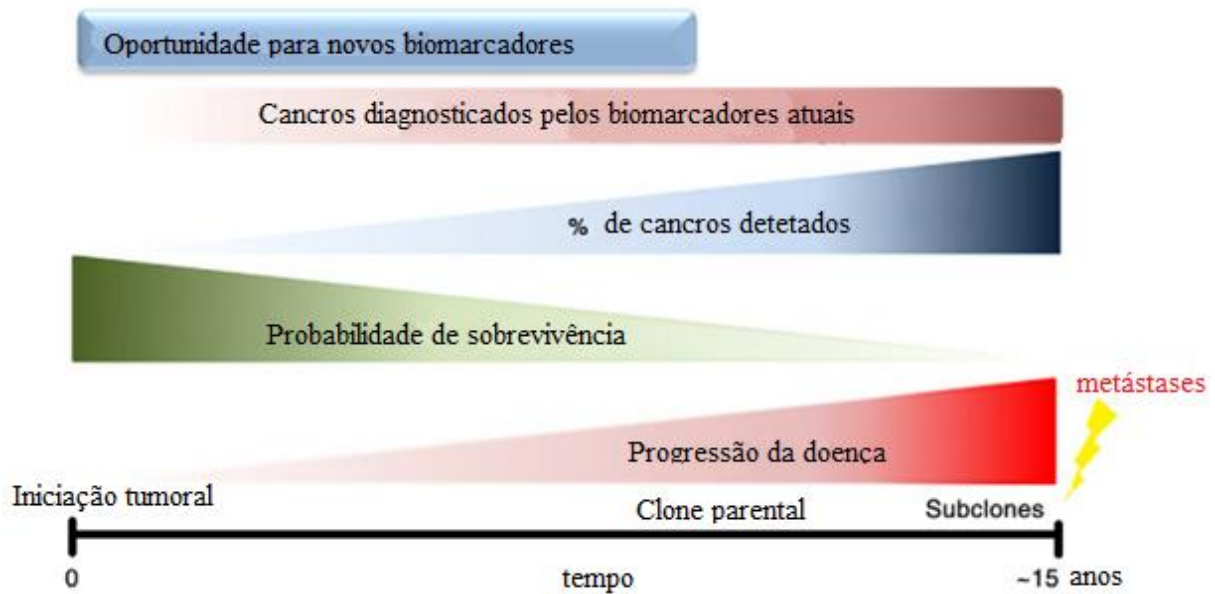
**Tabela I - Classificação histológica das lesões precursoras do ADP<sup>8,10</sup>**

Lesões PanINs	Lesões IPMNs	Lesões MCNs
PanIN1-a (lisa)	Tipo gástrico (atipia leve)	Cistadenoma mucinoso
PanIN1-b (papilar sem displasia)	Tipo intestinal (atipia moderada a severa)	Cistadenoma mucinoso “borderline”
PanIN-2 (papilar com displasia)	Tipo pancreatobiliar (atipia severa)	Cistadenocarcinoma mucinoso não invasivo (carcinoma in situ)
PanIN-3 (carcinoma in situ)	Tipo oncocítico (atipia severa)	

No que respeita ao desenvolvimento de metástases, Yachida et al. sequenciaram o genoma de sete metástases de cancro pancreático, para avaliarem a relação clonal entre o cancro primário e as metástases. Descobriram que as populações clonais que dão origem às metástases distantes estão representadas no carcinoma primário, mas que esses clones são

geneticamente evoluídos da sua origem parental, o clone não-metastático. Para além disso, analisaram quantitativamente o tempo de evolução genética do cancro pancreático, constatando a ocorrência de pelo menos uma década entre a primeira mutação e o nascimento da primeira célula cancerígena, ainda não-metastática. Segundo estes autores, pelo menos mais cinco anos serão necessários para a aquisição da capacidade metastática, falecendo os doentes, em média, dois anos mais tarde. Estes estudos sugerem que pode existir uma janela de oportunidade para o diagnóstico e tratamento do cancro do pâncreas em fase inicial, antes que este se dissemine <sup>11</sup> (Figura 1). Por outro lado, Rhim et al. apoiam a noção de que a disseminação precoce ocorre antes mesmo da formação do tumor primário. Estes autores, num estudo feito em ratos, relataram que células das PanINs, contendo apenas mutações no oncogene *KRAS*, migraram para grande distância da lesão pré-maligna glandular, para o tecido estromal circundante, invadindo e entrando na corrente sanguínea, acabando por se localizar no fígado inesperadamente cedo, antes de qualquer tipo de malignidade ser detetada por análise histológica rigorosa<sup>12</sup>.





**Figura 1** – Evolução temporal do ADP e sua correlação com a progressão da doença, a possibilidade do diagnóstico e a probabilidade de sobrevivência. (Adaptado de Chan, A., Diamandis, E., & Blasutig, I. (2013). Strategies for discovering novel pancreatic cancer biomarkers. *Journal of Proteomics*, 126–134. doi:10.1016/j.jprot.2012.09.025.)

### Estadiamento do ADP

O estadiamento do cancro do pâncreas exócrino é importante para estabelecer um prognóstico e o regime terapêutico a adotar para tratamento da lesão. Atualmente, o estadiamento deste tipo de neoplasia faz-se de acordo com a mais recente edição (a sétima) da classificação TNM do “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC)<sup>13</sup> (Tabela II). Esta classificação baseia-se no tamanho do tumor primário (T), no atingimento tumoral de nódulos linfáticos regionais (N) e na presença de metástases distantes (M). Será esta a classificação que iremos adotar na nossa exposição.

**Tabela II - Estadiamento TNM para o ADP<sup>13</sup>**

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Descrição</b>
IA	T1	N0	M0	Tumor limitado ao pâncreas, tendo 2cm ou menos de maior diâmetro, sem metástases regionais ou distais
IB	T2	N0	M0	Tumor limitado ao pâncreas, tendo mais do que 2cm de maior diâmetro, sem metástases regionais ou distais
IIA	T3	N0	M0	Tumor que se estende para além do pâncreas, mas sem atingir o tronco celíaco ou a artéria mesentérica superior, sem metástases regionais ou distais
IIB	T1, T2, ou T3	N1	M0	Tumor que não atinge o tronco celíaco ou a artéria mesentérica superior, mas com metástases nos nódulos linfáticos regionais e sem metástases distais
III	T4	N0 ou N1	M0	Tumor que atinge o tronco celíaco ou a artéria mesentérica superior (irressecável), sem metástases distantes
IV	T1, T2, T3, ou T4	N0 ou N1	M1	Tumor de qualquer tamanho, com metástases distantes

T, tamanho do tumor primário; N, atingimento tumoral dos nódulos linfáticos regionais; M, presença de metástases distantes.

### **Limitação do quadro clínico no diagnóstico precoce do ADP**

O cancro do pâncreas é uma doença insidiosa sem sinais e sintomas clínicos iniciais específicos, exceto quando o tumor primário está localizado na cabeça do pâncreas. Neste caso, o paciente apresenta precocemente sinais de obstrução biliar (icterícia obstrutiva). Vale a pena citar um estudo que examinou a utilidade da clínica no diagnóstico precoce do cancro do pâncreas. Este estudo, realizado em 185 doentes com ADP, verificou que, no momento do diagnóstico, um terço dos tumores da cabeça do pâncreas estava no estadio I e outro terço estava no estadio IV. Nenhum dos tumores do corpo e cauda estavam no estadio I, estando mais de 80% no estadio IV. No momento da apresentação, os sintomas mais frequentes foram

astenia, anorexia, perda de peso, dor abdominal e colúria. Os sintomas colestáticos foram mais comuns nos tumores da cabeça do pâncreas. Os autores concluíram que as queixas de astenia, anorexia e perda de peso não estavam relacionadas com o estadio do cancro. Verificou-se ainda que um grande intervalo de tempo entre o aparecimento dos sinais e sintomas, como dissemos, inespecíficos, e o diagnóstico de cancro do pâncreas estava associado com estadios mais avançados da doença. A icterícia obstrutiva parece ser uma condição com alguma especificidade para o cancro do pâncreas, devendo ser cuidadosamente investigada pelo médico assistente para descartar uma possível malignidade<sup>14</sup>.

### **Quem rastrear?**

O rastreio de base populacional para o ADP entre indivíduos assintomáticos permanece impraticável, devido à raridade da doença e à falta de testes de diagnóstico com adequada precisão. De facto, a probabilidade de um adulto saudável da população em geral ter cancro do pâncreas é de aproximadamente 1 para 10000 indivíduos, ou seja, 0,01%. Um teste de rastreio eficaz, neste contexto, exigiria não só uma alta sensibilidade para o cancro do pâncreas, mas também um nível de especificidade superior a 99%, de modo a manter um nível aceitavelmente baixo de resultados falsos positivos<sup>3,4</sup>.

Poderíamos, em alternativa, rastrear os doentes que possuíssem fatores de risco para desenvolvimento de ADP. Todavia, os fatores clínicos de risco são relativamente amplos e inespecíficos, e incluem a idade, a obesidade, o tabagismo, a diabetes e a pancreatite crónica (sendo a pancreatite crónica, no entanto, o mais específico destes fatores).

Efetivamente, o risco de desenvolver cancro pancreático, bem como o de outras neoplasias em geral, aumenta com a idade; a neoplasia pancreática é rara nas pessoas com menos de 18 anos de idade, com mais de 97% dos casos a ocorrerem em indivíduos com idade superior a 45 anos<sup>15</sup>. O peso corporal foi também ligado ao desenvolvimento de cancro

do pâncreas, com os indivíduos com excesso de peso (com IMC – índice de massa corporal – entre 25 e 30kg/m<sup>2</sup>) e os obesos (com IMC superior a 30kg/m<sup>2</sup>) a terem um aumento do risco, bem como um início mais precoce da doença, comparativamente com os indivíduos com peso normal (IMC entre 18 e 25kg/m<sup>2</sup>)<sup>16</sup>. Os fumadores e ex-fumadores que tenham parado de fumar há menos de 5 anos têm também um maior risco de terem cancro do pâncreas do que os não-fumadores e do que aqueles que pararam de fumar há mais de 5 anos. Este risco é ainda maior nos ditos fumadores “pesados” (fumam mais de 20 Unidades Maço Ano), comparativamente com fumadores leves e moderados. O risco de cancro pancreático também está aumentado entre os indivíduos que nunca fumaram mas estiveram expostos diariamente ao fumo do tabaco (durante muitas horas) durante a infância e também naqueles que estão expostos diariamente ao fumo do tabaco, durante muito tempo, em casa e/ou no trabalho<sup>17</sup>. Os doentes com diabetes têm também um risco aumentado para o cancro do pâncreas, não esquecendo que o próprio surgimento de diabetes pode ser um indicador precoce de cancro do pâncreas<sup>18</sup>. Por último, há uma associação comprovada entre o cancro do pâncreas e a pancreatite crónica. Os resultados de um estudo prospetivo de caso-controlo parecem sugerir que a pancreatite crónica possa estar intimamente relacionada com o cancro do pâncreas, embora não seja clara a relação de causa-efeito<sup>19</sup>. Uma meta-análise recente sugeriu que o tempo de evolução da pancreatite crónica para cancro do pâncreas seja de cerca de 20 anos, no entanto nem todos os casos de pancreatite crónica irão desenvolver cancro do pâncreas<sup>20</sup>. Por outro lado, um estudo britânico de caso-controlo retrospectivo analisou o uso de anti-inflamatórios não-esteróides (aspirina e derivados, fenamatos, derivados do ácido propiónico, derivados do ácido acético, inibidores da COX-2, oxicams e outros) em 1141 doentes com cancro do pâncreas e 7954 controlos obtidos através da base de dados “*UK General Practice Research Database*”. Descobriu que o uso de fármacos anti-inflamatórios não-esteróides em baixas doses (uso inferior a uma dose diária terapêutica de anti-inflamatórios não-esteróides

por dia) durante cerca de 5 anos antes do diagnóstico de cancro do pâncreas estava associado com uma redução significativa (entre 20 e 30%) do risco de cancro do pâncreas<sup>21</sup>. No entanto, há que ter em conta os efeitos adversos destes fármacos, como por exemplo o risco cardiovascular que está associado ao uso dos inibidores da COX-2<sup>21</sup>.

Uma outra abordagem do rastreio poderia consistir no rastreio precoce de grupos de alto risco selecionados. Estes grupos seriam constituídos por doentes com uma predisposição genética para o cancro pancreático (englobam apenas 5-10% dos casos de cancro pancreático), tais como os indivíduos com uma história familiar em vários membros da família (na primeira e/ou segunda gerações)<sup>22</sup>, os doentes com pancreatite hereditária (mutações no gene *PRSS1*), com síndrome de Peutz-Jeghers (mutações autossómicas dominantes no gene *STK11*), com síndrome de Lynch, com polipose adenomatosa familiar, com síndrome do cancro da mama-ovário hereditário (mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2*), com melanoma múltiplo atípico familiar (mutações no gene *CDKN2A* e, numa minoria dos casos, mutações no gene *CDK4*), e com síndrome de Li-Fraumeni (mutações recessivas no gene *TP53* ou *CHK2*)<sup>8,10,23</sup>.

Concluindo, aplicar estratégias de rastreio em pacientes com um ou mais dos fatores de risco atrás mencionados poderia ajudar a aumentar o diagnóstico de lesões neoplásicas pancreáticas em estádios iniciais. Para tal, é imperioso descobrir um teste de rastreio que seja realmente eficaz<sup>3</sup>.

O Consórcio Internacional de Rastreio do Cancro do Pâncreas de 2013 recomenda o rastreio de doentes com predisposição genética ou história familiar de cancro do pâncreas em parentes de primeiro e/ou segundo grau, através da ecoendoscopia e/ou RM/CPRM. No entanto, falta definir a idade de início do programa de rastreio, a sua regularidade temporal e como monitorizar os doentes em que se detetem lesões pancreáticas benignas<sup>24</sup>.

## **O papel da imagiologia no diagnóstico precoce do ADP**

São utilizados vários métodos de imagem para identificar tumores em doentes sintomáticos ou naqueles em que há uma forte suspeita de doença maligna no pâncreas. As principais modalidades de imagem para a deteção do ADP são a ecografia abdominal, a TC, a RM, a CPRE e a ecoendoscopia<sup>3</sup>.

Destes, a ecografia é frequentemente a melhor modalidade para o rastreio inicial, porque é minimamente invasiva, de fácil acesso e não expõe o paciente à radiação ionizante. É um exame que fornece informações acerca do local e tamanho das massas pancreáticas, da dilatação dos ductos biliares e pancreáticos, da proximidade do tumor com os vasos sanguíneos de maior calibre, da presença de ascite, do envolvimento de nódulos linfáticos e da existência de metástases hepáticas<sup>7</sup>. Contudo, é um exame dependente do operador e, devido à localização retroperitoneal (exceto a cauda) do pâncreas, bem como ao meteorismo frequentemente presente naquela zona anatómica, a ecografia abdominal muitas vezes não é eficaz na sua identificação, com uma sensibilidade geralmente abaixo de 70%<sup>3</sup>.

De facto, se a ecografia não for diagnóstica e o cancro pancreático for altamente sugerido pelos achados do exame clínico, realiza-se uma TC. É realizada uma TC trifásica: fase sem contraste, fase com contraste do parênquima pancreático e fase com contraste da veia porta. A doença metastática do fígado, peritoneu (ascite) e o envolvimento dos vasos peripancreáticos pode ser detetada, e geralmente indica inoperabilidade. A invasão para órgãos adjacentes (como o estômago e o cólon) e o envolvimento de nódulos linfáticos podem também ser detetados, mas estes achados não excluem a ressecção. O aumento da resolução espacial e a melhoria da visualização do parênquima pancreático e da vasculatura peripancreática com a TC com contraste tiveram um impacto significativo sobre o estadiamento preciso do ADP e melhoraram a deteção de tumores ressecáveis. A TC com contraste tem um valor preditivo negativo de 87% para ressecabilidade e de 100% para invasão vascular, sendo mais sensível

do que a TC sem contraste. A visualização clara do parênquima pancreático durante as várias fases de aumento do contraste permite a detecção de pequenas lesões pancreáticas<sup>7</sup>. No entanto, este exame expõe o paciente a radiação ionizante e, devido à necessidade de contraste intravenoso, tem limitações para alguns doentes, especialmente para os que têm insuficiência renal<sup>3</sup>.

A RM é o exame que mais recentemente tem sido usado para a imagiologia do pâncreas, principalmente nos doentes em que há uma elevada suspeita de lesão pancreática, mas em que não é possível a avaliação por TC ou ecografia. A CPRM é especialmente útil quando uma massa não é vista por outras modalidades de imagem, mas em que se conhece ou se suspeita de estenose ductal. Como técnica para diagnosticar doenças malignas do pâncreas, a CPRM tem uma sensibilidade de 84% e uma especificidade de 94%. A RM ponderada em difusão é uma técnica adicional que tem sido estudada no sentido de se saber se ajuda a diferenciar lesões benignas de doença maligna. Em relação à RM ponderada em difusão, foi relatada uma sensibilidade e uma especificidade de 96,2% e 98,6%, respetivamente, para a detecção de ADP<sup>7</sup>. No entanto, a RM (tanto a CPRM como a RM ponderada em difusão) é muitas vezes difícil de usar, pois os doentes têm de permanecer imóveis para se obter uma imagem exata e também pelo seu elevado custo e baixa disponibilidade por parte das instituições, sendo apenas utilizada depois da ecografia ou da TC<sup>3</sup>.

A CPRE é uma técnica endoscópica que pode ser usada para demonstrar a anatomia pancreática e dos ductos biliares. É útil nos casos de obstrução biliar para confirmar o local exato da obstrução e pode ser usada para orientar a escovagem e lavagem ductal, fornecendo tecido para diagnóstico<sup>7</sup>.

Para o diagnóstico do cancro do pâncreas, a ecoendoscopia é essencialmente realizada em doentes com pancreatite crónica em que há suspeita de cancro do pâncreas (porque a inflamação crónica que acompanha a pancreatite crónica pode ocultar um pequeno foco

maligno) e em doentes com uma aparente massa pancreática, sendo de grande utilidade no esclarecimento da etiologia dos nódulos pancreáticos<sup>8</sup>. A ecografia endoscópica permite também a avaliação da ressecabilidade tumoral e a deteção de invasão vascular bem como a possibilidade de colheita de amostras para exame citopatológico. Para a colheita de amostras, usa-se a punção aspirativa por agulha fina guiada por ecoendoscopia (do inglês EUS-FNA – *endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration*) e a realização de biopsias, mas é um procedimento invasivo e há uma taxa de complicações associadas (nomeadamente de pancreatite) inferior a 2%<sup>25</sup>. Uma meta-análise recente avaliou 34 estudos distintos (para um total de 3644 doentes), nos quais a EUS-FNA foi utilizada para avaliar massas pancreáticas sólidas. A sensibilidade e especificidade médias da EUS-FNA para o ADP foram 88,6% e 99,3%, respetivamente<sup>26</sup>. Apesar de apresentar uma alta eficácia diagnóstica, a EUS-FNA tem um baixo valor preditivo negativo para o diagnóstico do cancro do pâncreas<sup>27</sup>. Para além disso, os resultados são dependentes do operador e não é capaz de detetar doença metastática distante<sup>25</sup>. De acordo com as “guidelines” da Sociedade Europeia de Endoscopia Gastrointestinal, a EUS-FNA de massas pancreáticas parece ter mais eficácia diagnóstica, particularmente para pequenas lesões, do que a FNA guiada por ecografia ou por TC. De facto, é recomendado que, nos casos em que esteja indicada a colheita de uma amostra de uma massa suspeita de cancro do pâncreas, a EUS-FNA seja o procedimento de primeira linha. Também se recomenda que nos doentes com alta suspeita clínica para cancro do pâncreas e em que tenha havido um resultado indeterminado ou negativo após a colheita de uma primeira amostra, mesmo tendo sido utilizada a EUS-FNA, se realize uma segunda EUS-FNA<sup>27</sup>.

As principais desvantagens da imagiologia nos programas de rastreio são o custo elevado e a elevada taxa de falsos positivos<sup>3</sup>.



## **Biomarcadores genéticos**

Há uma alteração da regulação de genes relacionados com o cancro no ADP que se traduz numa elevada frequência de mutações no oncogene *KRAS* (95%) e nos genes supressores tumorais *CDKN2A* (85%), *TP53* (75%), *SMAD4* (55%). Também se verificaram modificações na expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês EGFR – *epidermal growth factor receptor*), expressões aberrantes do recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (do inglês HER2 – *human epidermal growth factor receptor 2*) e de outros recetores de tirosina cinase e seus ligandos, e das isoformas do fator de crescimento transformante beta (do inglês TGF- $\beta$  – *transforming growth factor beta*)<sup>2</sup>.

Um estudo realizado por Missiaglia E. et al. concluiu também que os genes *S100P*, *S100A4*, *claudina4*, *PSCA*, *lipocalina1*, *TFF1* e 2 e *galectina3* tinham a sua expressão muito mais aumentada nas linhas celulares cancerígenas pancreáticas do que nas linhas celulares epiteliais ductais pancreáticas normais imortalizadas<sup>28</sup>.

Ao todo foram descritos 1100 genes com expressão aumentada no ADP invasivo, assim como nas lesões PanINs, o que os torna bons candidatos a biomarcadores de diagnóstico<sup>6</sup>. Nesta revisão referiremos apenas os genes que se têm mostrado mais promissores (Tabela III).

- **KRAS**

As mutações pontuais que ativam o oncogene *KRAS* constituem a primeira alteração genética conhecida que ocorre no ADP e a mais frequente (presente em mais de 90% dos casos). Ocorre esporadicamente no tecido pancreático normal, é detetada em 30% das neoplasias iniciais e em quase 100% dos ADPs avançados. Estas mutações podem ser pesquisadas no tecido pancreático, suco pancreático, biliar, plasma e fezes dos doentes com adenocarcinoma pancreático<sup>2,29</sup>. Num estudo realizado em amostras teciduais de 80 doentes com ADP e 20 doentes com pancreatite crónica, o *KRAS* demonstrou sensibilidade de 70% e especificidade de 100%<sup>30</sup>.

As mutações *KRAS* predisõem para a ocorrência de outras mutações, resultando no desenvolvimento de tumor pancreático<sup>2</sup>. Dados recentes indicam que 36%, 44% e 87% das lesões PanIN-1, PanIN-2 e PanIN-3 apresentam esta mutação, respetivamente<sup>31</sup>.

Para além do cancro pancreático, as mutações *KRAS* também são detetadas na pancreatite crónica, inclusive nos casos que não irão desenvolver adenocarcinoma pancreático, e nos diferentes cancros gástricos, principalmente nos tumores colo-rectais<sup>32</sup>. A sua utilidade diagnóstica é portanto muito limitada pela sua falta de sensibilidade e de especificidade<sup>2</sup>.

- **CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup>**

No ADP esporádico, a perda da proteína supressora tumoral p16<sup>INK4A</sup> ocorre por mutação, deleção ou hipermetilação do gene *CDKN2A* (o seu promotor) em 80% a 95% dos casos<sup>2</sup>.

A proteína p16<sup>INK4A</sup> tem a função de inibir a ligação da ciclina D às cinases dependentes de ciclina. A perda desta proteína vai resultar num aumento da taxa de proliferação celular, assim como num aumento da fosforilação do retinoblastoma<sup>2</sup>.

Embora estas mutações possam ocorrer no ADP, estas não são específicas do cancro pancreático, pois têm sido observadas noutros tumores malignos, como sejam os casos familiares de melanoma maligno e o cancro da mama<sup>2</sup>.

A perda da p16<sup>INK4A</sup> ocorre nos estádios precoces das lesões PanINs e, assim como outras alterações genéticas, confere um risco individual acrescido para o desenvolvimento de pancreatite crónica e potencialmente do cancro pancreático. A metilação do *CDKN2A* pode vir a ser um útil indicador de malignidade das células epiteliais pancreáticas, tendo sido proposta como marcador diagnóstico auxiliar para a diferenciação endoscópica entre doença pancreática benigna e maligna<sup>2</sup>. Num estudo realizado em amostras teciduais de 80 doentes com ADP e 20 doentes com pancreatite crónica, o *CDKN2A* demonstrou sensibilidade de 13% e especificidade de 100% para detetar o ADP<sup>30</sup>.

Contudo, o *CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup>* sozinho ou em combinação com outros marcadores moleculares não tem aplicabilidade clínica, sendo necessários mais estudos para estabelecer uma sensibilidade e especificidade úteis<sup>2</sup>.

- **TP53**

O supressor tumoral *TP53* é o gene mais frequentemente mutado nos cancros humanos<sup>2</sup>. As mutações neste gene são encontradas em aproximadamente 70% dos doentes com ADP e são consideradas como um evento relativamente específico na transição das lesões PanINs para o ADP invasivo<sup>6</sup>. Num estudo realizado em amostras teciduais de 80 doentes com ADP e 20 doentes com pancreatite crónica, o *TP53* demonstrou sensibilidade de 24% e especificidade de 90%<sup>30</sup>.

Visto que as mutações do *TP53* surgem num estadio tardio do desenvolvimento do cancro pancreático, o *TP53* não serve como biomarcador para deteção precoce<sup>2</sup>.

- **SMAD4**

O *SMAD4* é um gene supressor tumoral, membro da família SMAD de fatores de transcrição, sendo ativado pelo recetor cinase da serina-treonina em resposta ao TGF- $\beta$ , à proteína morfogénica do osso e à sinalização com activina<sup>2</sup>.

Este gene está inativado em 55% dos cancros pancreáticos<sup>7</sup>. Embora a perda desta proteína ocorra também noutras neoplasias, a perda do *SMAD4* é mais sensível e específica para ADP do que para outros tumores malignos. A sua inativação tanto ocorre pela deleção de ambos os alelos (35%) como pela mutação de um alelo associado à perda do outro alelo (20%)<sup>2</sup>. A deleção do *SMAD4* surge em estadios tardios das lesões PanINs<sup>33</sup>.

Num estudo realizado em amostras teciduais de 80 doentes com ADP e 20 doentes com pancreatite crónica, o *SMAD4* demonstrou sensibilidade de 78% e especificidade de 57%<sup>30</sup>.

São necessários mais estudos para comprovar a sua utilidade diagnóstica<sup>2</sup>.

- **DJ-1**

O *DJ-1* é um oncogene que está envolvido na ativação da proteína cinase B e implicado na quimiorresistência, tendo o papel de regular a invasão tumoral e a metastização no ADP. A sua expressão está aumentada em 89,4% dos casos de ADP humano e está correlacionada com um maior tamanho tumoral (T3/T4), com a invasão tumoral e com um pior prognóstico<sup>6</sup>.

Mais recentemente, um estudo descobriu que o *DJ-1* estava aumentado no soro dos doentes com ADP comparativamente com os indivíduos com pancreatite crónica e os saudáveis, sendo a sua sensibilidade de 79,2% e especificidade de 79,1%<sup>34</sup>.

**Tabela III – Biomarcadores genéticos para o diagnóstico do ADP**

<b>Biomarcador Genético</b>	<b>Tipo de amostras</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
<i>KRAS</i>	Tecido pancreático	80 ADP vs 20 PC	70%	100%	30
<i>CDKN2A</i>	Tecido pancreático	80 ADP vs 20 PC	13%	100%	30
<i>TP53</i>	Tecido pancreático	80 ADP vs 20 PC	24%	90%	30
<i>SMAD4</i>	Tecido pancreático	80 ADP vs 20 PC	78%	57%	30
<i>DJ-1</i>	Soro	47 ADP vs 43 PC vs 40 CS	79,2%	79,1%	34

CS - controlos saudáveis; PC - pancreatite crónica.

### **Biomarcadores proteicos**

Há várias proteínas das células tumorais e do estroma que podem ser extraídas dos fluidos corporais e usadas para deteção do ADP em estadios precoces. Em seguida descrevem-se os biomarcadores proteicos mais utilizados para esse fim, no soro e no suco pancreático<sup>2</sup> (Tabelas IV e V).

- **CEA**

O antigénio carcinoembrionário (do inglês CEA – *carcinoembryonic antigen*) é um grupo heterogéneo de glicoproteínas que contêm 50-80% de hidratos de carbono e uma única cadeia proteica com cerca de 800 aminoácidos. Foi descoberto em 1965 como um marcador para o cancro do cólon, mas veio depois a ser utilizado como o primeiro biomarcador tumoral para a deteção do cancro do pâncreas<sup>2,35</sup>. O seu valor “cut-off” é de 5 ng/ml. Uma meta-análise

envolvendo 1323 doentes encontrou uma sensibilidade média de diagnóstico de 54% e uma especificidade média de diagnóstico de 79%<sup>35</sup>. A sua baixa sensibilidade, combinada com o facto de se encontrar em níveis elevados no cancro da mama, estômago e colo-rectal, demonstraram que, atualmente, a deteção do CEA não é aplicável para o diagnóstico do ADP<sup>35</sup>. Como tal, nos últimos 20 anos o CEA foi sendo substituído pelo CA19-9, que tem um melhor desempenho diagnóstico.

Uma vez que o CEA não pode ser usado sozinho, a sua utilidade clínica pode estar na combinação com outros biomarcadores, utilizados com a finalidade da deteção precoce. Assim sendo, quando combinado com o antígeno de hidratos de carbono (do inglês CA – *carbohydrate antigen*) 19-9 num estudo de coorte de 123 doentes com ADP e 58 com doença pancreática benigna, a sua sensibilidade e especificidade aumentaram para 86% e 72%, respetivamente<sup>36</sup>. No entanto, os dados disponíveis não são ainda suficientes para justificar a sua utilização no diagnóstico do cancro do pâncreas, mesmo quando combinado com o CA19-9<sup>37</sup>.

- **CA19-9**

O CA19-9 é uma glicoproteína do tipo mucina, de alto peso molecular (> 400kD), que foi descoberta em 1981. É sintetizada normalmente pelas células dos ductos do pâncreas e da vesícula biliar humana e pelo epitélio gástrico, do cólon, endometrial e salivar. Embora tenha sido originalmente usado como um marcador para o cancro colo-rectal, verificou-se que tinha um melhor desempenho servindo como um marcador para o cancro pancreático. Atualmente, é o único biomarcador sérico aprovado pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) para o diagnóstico do ADP. Tem um valor “cut-off” entre 37 e 40 U/mL<sup>2,4,35,37</sup>.

Sendo o CA19-9 o marcador tumoral sérico padrão para o ADP, este tem sido o marcador mais avaliado de todos, tendo-se realizado já inúmeros ensaios clínicos durante um período de

tempo relativamente longo<sup>37</sup>. Numa grande revisão da literatura que resume todos esses estudos, os autores descobriram que o CA19-9 tem uma sensibilidade média de 79% e uma especificidade média de 82%<sup>35</sup>. Esses autores concluíram ainda que os níveis elevados do CA19-9 igualmente presentes na icterícia não-maligna resultam num número significativo de falsos positivos, recomendando que o CA19-9 seja combinado com outros marcadores para melhorar a sua especificidade.

As principais limitações do CA19-9 incluem o seu frequente aumento em condições não malignas, como a icterícia obstrutiva não maligna, já referida, a pancreatite, a colangite, a colangite esclerosante primária, a cirrose, e a sua incapacidade para detetar tumores malignos em estadios iniciais. É de salientar ainda que o CA19-9 pode ser positivo em doentes com outros cancros gastrointestinais, como o esofágico, gástrico, colo-rectal e das vias biliares. Com vista a ultrapassar estas limitações, tem sido proposto o uso de valores de “cut-off” mais elevados e a associação de outros marcadores tumorais<sup>2,3,35</sup>.

O CA19-9 possui uma estrutura siálica originária do antigénio do grupo sanguíneo Lewis. Consequentemente, não se expressa nos indivíduos com genótipo Lewis negativo (5-10% da população Caucasiana), pelo que os níveis séricos de CA19-9 nestes indivíduos vão ser normais, mesmo na presença de cancro do pâncreas<sup>2,3,35</sup>.

Uma outra limitação é o facto de o CA19-9 ter uma baixa sensibilidade para tumores de pequeno diâmetro.

Por último, as diferenças que existem no desenho dos ensaios clínicos contribuem para a falha na sua aplicabilidade clínica<sup>2,3,35</sup>.

Alguns grupos não recomendam que a determinação do CA19-9 seja usada como teste de rastreio para o cancro do pâncreas<sup>38,39</sup>. Dada a baixa incidência do ADP, o CA19-9 também não é recomendado pelo Grupo Europeu de Marcadores Tumorais<sup>40</sup> nem pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica<sup>38</sup>.

Assim sendo, vários autores têm-se questionado sobre se o CA19-9 deve ser utilizado como uma ajuda no diagnóstico do cancro do pâncreas esporádico. A maior parte deles concluiu que embora este marcador não seja suficientemente preciso para ser usado no rastreio de doentes assintomáticos, é atualmente o teste sanguíneo mais útil para diferenciar entre doenças pancreáticas benignas e malignas<sup>2</sup>. Contudo, de acordo com as “guidelines” do Grupo Europeu de Marcadores Tumoraes, o CA19-9 tem valor limitado no diagnóstico do ADP em estadios iniciais<sup>40</sup>. Pode, ainda assim, complementar os resultados dos exames imagiológicos, como a TC e a ecoendoscopia<sup>2</sup>.

- **Outros biomarcadores proteicos**

Nas duas últimas décadas (Tabela IV), muitos outros biomarcadores proteicos têm sido testados para detetar o ADP, mas não se mostraram superiores ao CA 19-9<sup>2</sup>. Descrevem-se de seguida os mais recentes e com potencial aplicabilidade clínica.

Ebrahimi et al. mediram os níveis séricos do fator de crescimento endotelial vascular, do fator de necrose tumoral alfa, da interleucina (IL) -1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e o antagonista do recetor da IL-1 (IL-1RA) em 51 doentes com ADP e em 62 voluntários saudáveis. Descobriram que a IL-8 estava aumentada no soro dos doentes com ADP em comparação com os controlos saudáveis, assim como a IL-1RA, IL-6 e IL-10<sup>41</sup>.

O CA242 é um glicoconjugado associado ao cancro expresso na mucina e descoberto predominantemente no soro dos doentes com cancro do pâncreas. É um antígeno de hidratos de carbono sialilado co-expresso com o CA50 e situado na mesma macromolécula<sup>35</sup>. O seu valor “cut-off” é de 20 U/ml. Dois relatórios<sup>42,43</sup> examinaram a eficácia diagnóstica do CA242, concluindo que a sensibilidade média do CA242 é de 78% e a especificidade média de 90%.



Os níveis séricos do fator de crescimento específico de tumor (do inglês TSGF – *tumor specific growth factor*) acima de um valor “cut-off” de 71 U/ml foram considerados como sendo 92% sensíveis e 83% específicos para o cancro do pâncreas, sendo mais sensíveis do que o CA242 e o CA19-9. De modo significativo, quando o desempenho dos três marcadores foi comparado em diferentes estadios de cancro do pâncreas, a tendência geral era a de serem menos sensíveis a detetar casos em estadio I e mais sensíveis a detetar casos em estadio IV. Diversos fatores podem explicar esta observação. Um deles é o facto de que com o aumento do estadio tumoral aumenta a carga tumoral, sendo maior a produção do marcador tumoral e, conseqüentemente, maior o seu valor no soro<sup>42</sup>.

O TSGF continua a ser o mais sensível a detetar doentes em estadio I (sensibilidade de 60%, em comparação com 30% para o CA242 e 40% para o CA19-9), sugerindo que poderia ser potencialmente útil na identificação da doença em estadio inicial<sup>42</sup>. Curiosamente, num estudo realizado por Jiang et al., o nível sérico dos marcadores TSGF e CA242 foi mais elevado nos doentes com cancro da cabeça do pâncreas do que nos doentes com cancro do corpo, cauda ou de toda a glândula. Quando os três marcadores foram combinados em conjunto, estes foram 100% específicos (Tabela V) para o diagnóstico de cancro do pâncreas, ao passo que nenhum marcador por si só poderia alcançar a especificidade perfeita. A única grande limitação deste estudo foi não investigar a especificidade destes marcadores na presença de condições benignas que causassem icterícia obstrutiva<sup>42</sup>.

A osteopontina (OPN), uma glicoproteína extracelular encontrada nos osteoblastos, também foi proposta como um biomarcador sérico para o cancro pancreático<sup>4</sup>. Koopmann et al. determinaram os níveis séricos da OPN em 50 doentes com cancro do pâncreas ressecável e em 22 indivíduos saudáveis. Verificaram que esta glicoproteína foi detetada em doentes com ADP ressecável com uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 97%. Em contrapartida, apenas 62% dos doentes deste estudo de coorte tinham o CA19-9 elevado<sup>44</sup>.

Simeone et al. mediram os níveis séricos da molécula de adesão celular tipo 1 relacionada com o antígeno carcinoembrionário (do inglês CEACAM1 – *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*) em 81 doentes com ADP, em 20 doentes com PanINs, em 53 doentes com pancreatite crónica e em 61 controlos normais. A CEACAM1 mostrou ser melhor do que o CA19-9 a discriminar entre doentes com ADP e os controlos normais. Os seus níveis séricos estão também aumentados nos doentes com PanIN-3, em comparação com aqueles com PanIN-1 e PanIN-2, mas o biomarcador não foi capaz de diferenciar os doentes com pancreatite crónica dos doentes com cancro<sup>45</sup>.

Num estudo realizado por Gold et al., o anticorpo monoclonal anti-mucina 1, designado por PAM4, foi encontrado no soro, plasma e também no suco pancreático de doentes com cancro do pâncreas, tendo sido associado com eventos precoces do desenvolvimento do ADP invasivo. A sua sensibilidade para detetar o ADP foi de 82%, com uma especificidade de 95% no soro de 68 doentes com ADP e 19 controlos saudáveis<sup>46</sup>. Curiosamente, o PAM4 mostrou uma sensibilidade diagnóstica dependente do estadio, demonstrando sensibilidades de 62%, 86% e 91% em doentes com estadio I, II e estadios avançados (estadios III e IV) de ADP, respetivamente<sup>46</sup>.

Um novo membro da superfamília do fator de necrose tumoral (do inglês TNF – *tumor necrosis factor*) chamado ligando indutor da proliferação (do inglês APRIL – *proliferation-inducing ligand*) foi descrito como um potencial biomarcador do ADP<sup>2</sup>. Para determinar se os níveis séricos do APRIL podem ser usados para detetar o cancro do pâncreas, eles foram examinados em conjunto com o CEA e o CA19-9, em 67 doentes com cancro do pâncreas e em 55 doentes com doenças pancreáticas benignas<sup>47</sup>. Verificou-se que o APRIL está aumentado nos doentes com cancro do pâncreas, tendo sido demonstrada uma correlação positiva com o CEA e o CA19-9. Este estudo mostrou uma sensibilidade e especificidade de 70,1% e 85,5%, respetivamente, para o APRIL sozinho, 83,6% e 80% (Tabela V) quando

combinado com o CA19-9 e o CEA e 88,1% e 78,2% (Tabela V) quando usado apenas em combinação com o CA19-9<sup>47</sup>. Embora fornecendo resultados promissores, as amostras deste estudo eram pequenas e não englobavam doentes com cancro do pâncreas em estadio I.

A plectina-1, uma proteína da família das plaquininas, demonstrou, embora tendo como base uma pequena amostra de doentes, estar expressa em 100% dos ADP, em 60% das lesões PanIN-3 e em 4% das lesões PanIN-1 e PanIN-2.<sup>6</sup> A sensibilidade (87%) e a especificidade (98%) da plectina-1 permitiram diferenciar as lesões PanIN-3 (n=15) e o ADP (n=41) do pâncreas normal (n=4), da pancreatite crónica (n=15) e das lesões PanIN-1 (n=14) e PanIN-2 (n=26)<sup>48</sup>.

Chang et al. demonstraram que a proteína 2 ligante da UL16 (do inglês ULBP2 – *UL16 binding protein 2*) é uma proteína que poderá vir a ser utilizada como biomarcador do ADP. A elevação dos seus valores no soro foi observada em doentes com cancro do pâncreas (n=154), comparativamente com doentes saudáveis (n=142). Foi determinada uma sensibilidade de 83,8% e uma especificidade de 73,9%<sup>49</sup>. Para além disso, a ULBP2 foi comparável ao CA19-9 no que respeita a diferenciar os doentes com cancro do pâncreas em estadios I e II dos controlos saudáveis<sup>49</sup>.

A proteína do choque térmico 70 (do inglês HSP70 – *heat shock protein 70*) demonstrou estar significativamente elevada nos doentes com cancro do pâncreas (n=23), em comparação tanto com os doentes com pancreatite crónica (n=12) como com os controlos saudáveis (n=10). Embora a HSP70 tenha demonstrado uma sensibilidade e especificidade aceitáveis de 74% e 90%, respetivamente, não conseguiu diferenciar entre doentes com cancro do pâncreas e aqueles com pancreatite crónica<sup>50</sup>.

A citocina 1 inibidora dos macrófagos (do inglês MIC-1 – *macrophage inhibitory cytokine-1*) é um membro da família TGF- $\beta$ , tendo a sua expressão aumentada em 88% dos doentes com ADP<sup>6</sup>. Wang et al., num estudo recente, analisaram os níveis de MIC-1 séricos

em 807 doentes com ADP, em 115 doentes com tumores pancreáticos benignos, em 50 doentes com pancreatite crónica, em 240 doentes com oito neoplasias epiteliais comuns e em 500 controlos saudáveis. Verificou que os níveis séricos de MIC-1 eram mais elevados em doentes com ADP do que em doentes com outras doenças malignas (testaram-se os níveis de MIC-1 em oito neoplasias epiteliais comuns – adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma da próstata, adenocarcinoma gástrico, carcinoma ovárico, carcinoma da mama, carcinoma da tiroide, carcinoma esofágico de células escamosas e carcinoma do pulmão não-pequenas-células). Nesse mesmo estudo, comparou-se o valor diagnóstico para o ADP do MIC-1 com o CA19-9, o CEA e o CA242, tendo-se verificado que o MIC-1 tem mais valor diagnóstico do que os outros três marcadores. Contudo, os autores relataram que os níveis séricos de MIC-1 foram insuficientes para discriminar doentes com ADP de tumores pancreáticos benignos (sensibilidade de 74%), embora mesmo assim tenham sido mais eficazes do que o CA19-9 sérico neste estudo (sensibilidade de 52%). Concluíram ainda que o MIC-1 não é melhor do que o CA19-9 na diferenciação entre doentes com cancro e pancreatite, o que se pode atribuir à associação do MIC-1 com a inflamação. Uma outra descoberta interessante deste estudo é que o MIC-1 mostrou uma eficácia diagnóstica superior comparativamente com o CA19-9 no diagnóstico do ADP em estadios precoces (estadios I e II: MIC-1 – sensibilidade de 65,1%; CA19-9 – sensibilidade de 43,0%). Mesmo nos doentes com a doença num estadio muito precoce (estadio Ia), o MIC-1 mostrou uma sensibilidade de 62,5%, comparativamente com 25% do CA19-9. Para além disso, a combinação do CA19-9 com o MIC-1 aumentou significativamente a taxa de deteção do ADP inicial de 43% para 78%, tendo sido ainda mais elevada do que o uso simultâneo do CA19-9, CEA e CA242 (58,1%)<sup>51</sup>.

**Tabela IV- Biomarcadores proteicos para o diagnóstico do ADP**

<b>Biomarcador Proteico</b>	<b>Tipo de amostras</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
CEA	Soro	1323 doentes com SDP (13 estudos)	54%	79%	35
CA19-9	Soro	2283 doentes com SDP (22 estudos)	79%	82%	35
CA242	Soro	201 doentes ADP vs 270 CS vs 82 DPB	78%	90%	42,43
TSGF	Soro	96 doentes ADP vs 52 PC vs 200 CS	92%	83%	42
OPN	Soro	50 doentes ADP vs 22 CS	80%	97%	44
CEACAM1	Soro	81 doentes ADP vs 20 PanINs vs 53 PC vs 61 CS	85%	98%	45
PAM4	Soro	68 doentes ADP vs 19 CS	82%	95%	46
APRIL	Soro	67 doentes ADP vs 55 DPB	70,1%	85,5%	47
Plectina-1	Soro	56 doentes ADP + PanIN-3 vs 55 DPB vs 4 CS	87%	98%	48
ULBP2	Soro	154 doentes ADP vs 142 CS	83,8%	73,9%	49
HSP70	Soro	23 doentes ADP vs 12 PC vs 10 CS	74%	90%	50
MIC-1	Soro	807 doentes ADP vs 168 DPB vs 240 com oito NEC vs 500 CS	65,8%	96,4%	51
S100P	Suco pancreático	32 doentes ADP vs 32 PC	83,6%	75%	52
hTERT	Suco pancreático	115 doentes lesão tumoral (ADP ou IPMN)	85%	82%	53

Os valores de sensibilidade e especificidade não são comparáveis, pois os estudos usaram amostras diferentes e casos de ADP em estadios diferentes. CS, controlos saudáveis; DPB, doença pancreática benigna; NEC, neoplasias epiteliais comuns; PC, pancreatite crónica; SDP, suspeita de doença pancreática.

A medição da proteína S100P no suco pancreático de 32 doentes com ADP e 32 doentes com pancreatite crónica discriminou efetivamente o ADP da pancreatite, com uma sensibilidade e especificidade de 83,6% e 75%, respetivamente<sup>52</sup>.

A transcriptase reversa da telomerase humana (do inglês hTERT – *human telomerase reverse transcriptase*) é a maior subunidade catalítica da telomerase humana e os seus níveis de ácido ribonucleico (ARN) mensageiro correlacionam-se fortemente com a ativação da telomerase. A hTERT foi sugerida como possível biomarcador diagnóstico para o ADP. Examinando a expressão da hTERT em 115 amostras de suco pancreático de doentes com ADP e IPMN, foi revelado que enquanto a citologia foi 47% sensível e 89% específica em distinguir as células malignas das benignas, a imunohistoquímica para hTERT foi, em média, 85% sensível e 82% específica na obtenção desta distinção. O desempenho diagnóstico da hTERT, como alternativa, nos casos de citologia negativa como método para identificação precoce de doença maligna e lesões pré-malignas, particularmente em indivíduos de alto risco, parece demonstrar grande potencial, precisando, contudo, de ser analisada em estudos com amostras maiores<sup>53</sup>.

- **Associações de biomarcadores proteicos**

As associações de biomarcadores proteicos para o diagnóstico do ADP no soro (Tabela V) aumentaram, em muitos casos, o poder de diagnosticar com precisão o ADP em comparação com qualquer marcador isolado<sup>3</sup>.

Brand et al. relataram a sua análise de 83 proteínas circulantes no soro de doentes com ADP (n=333), comparada com condições pancreáticas benignas (n=144) e controlos saudáveis (n=227)<sup>54</sup>. Os marcadores selecionados na análise incluíram 7 que previamente tinham demonstrado capacidade diagnóstica para o cancro do pâncreas: CEA, CA19-9, MIC-1, osteoprotegerina (do inglês OPG – *osteoprotegerin*), inibidor tecidual da metaloproteinase

tipo 1 (do inglês TIMP-1 – *tissue inhibitor of metalloproteinase type 1*), molécula de adesão intercelular 1 (do inglês ICAM-1 – *intercelular adhesion molecule 1*), proteína amiloide sérica A e proteína do epidídimo humano 4. Os restantes 75 marcadores analisados incluíam citocinas, hormonas, quimiocinas, fatores apoptóticos e apolipoproteínas. Inicialmente analisaram-se os níveis séricos de cada biomarcador nos doentes com ADP, nos doentes com doenças pancreáticas benignas e nos controlos saudáveis. Seguidamente, usando o algoritmo “Metropolis” com simulação de Monte Carlo, todas as possíveis combinações de 2, 3 e 4 biomarcadores foram avaliadas no que respeita à sensibilidade e especificidade para o ADP. Comparou-se a eficácia das combinações de biomarcadores na discriminação entre os doentes com ADP e os controlos saudáveis e na discriminação entre os doentes com ADP e os doentes com doenças pancreáticas benignas. A performance de cada uma das combinações de biomarcadores foi comparada com a performance do CA19-9 sozinho. Os autores observaram que o conjunto de marcadores CA19-9, ICAM-1 e OPG foi o melhor a discriminar os doentes com ADP dos controlos saudáveis com uma sensibilidade e especificidade de 78% e 94%, respetivamente, comparando com uma sensibilidade de 51,4% e uma especificidade de 90% para o CA19-9 sozinho. No mesmo estudo, o conjunto composto por CA19-9, CEA e TIMP-1 foi o melhor a discriminar os doentes com ADP daqueles com doença pancreática benigna com uma sensibilidade e especificidade de 71% e 89%, respetivamente, comparando com uma sensibilidade de 52,1% e uma especificidade de 90,2% para o CA19-9 sozinho<sup>54</sup>.

Poruk et al. determinaram os níveis séricos de CA19-9, OPN e TIMP-1 em 86 doentes com ADP, 86 controlos saudáveis e 48 doentes com pancreatite crónica. Conseguiram demonstrar que os níveis séricos de OPN e TIMP-1 em conjunto permitiam distinguir o ADP da pancreatite crónica e dos indivíduos saudáveis<sup>55</sup>. No mesmo estudo, também se verificou que a combinação de OPN e TIMP-1 é capaz de distinguir os estadios precoces (I e II) do ADP dos indivíduos saudáveis e dos doentes com pancreatite crónica. Por fim, ficou

demonstrado que a combinação CA19-9 + OPN + TIMP-1 apresentava maior sensibilidade (87%) e maior especificidade (91%) na discriminação entre o ADP e os outros grupos controlo (indivíduos saudáveis e doentes com pancreatite crónica) do que as apresentadas pelo uso do CA19-9 isoladamente (sensibilidade de 84% e especificidade de 88%)<sup>55</sup>.

Makawita et al., num estudo recente, avaliaram o papel de quatro candidatos a biomarcadores diagnósticos do ADP quando combinados com o CA19-9 em amostras séricas de 100 doentes com ADP em diferentes estadios e de 92 controlos saudáveis. Os biomarcadores avaliados foram o fator 1 beta de regeneração dos ilhéus de Langerhans (do inglês REG1B – *regenerating islet-derived 1 beta*), a sincolina (do inglês SYCN – *syncollin*), a proteína 2 homóloga do gradiente anterior (do inglês AGR2 – *anterior gradient homolog 2 protein*) e a enzima lisil oxidase-like 2 (do inglês LOXL2 – *lysyl oxidase-like 2*), tendo o CA19-9 mostrado ser mais eficaz como biomarcador diagnóstico em combinação com estes quatro candidatos, do que usado sozinho. As combinações CA19-9 + SYCN + REG1B, CA19-9 + SYCN + AGR2, CA19-9 + SYCN + LOXL2 e CA19-9 + SYCN foram as melhores a distinguir os doentes com ADP em estadios precoces (I e II) dos controlos saudáveis<sup>56</sup>.

Nolen et al. avaliaram 67 biomarcadores em soros pré-diagnósticos obtidos a partir de doentes que foram diagnosticados com ADP enquanto estavam inscritos num programa de rastreio do cancro da próstata, pulmão, colo-rectal e ovário. Este programa de rastreio, realizado nos Estados Unidos, era um ensaio multicêntrico randomizado que ajudava a avaliar o impacto dos procedimentos de deteção precoce para o cancro da próstata, pulmão, colo-rectal e ovário na mortalidade específica da doença. Entretanto, na sequência do estudo, foram sendo identificados casos de cancro pancreático de entre os participantes deste grande estudo de coorte. Aproveitando a realização deste estudo, decidiram-se avaliar 67 biomarcadores no diagnóstico do cancro do pâncreas em soros pré-diagnósticos de 343 doentes com ADP,



comparando com 227 controlos saudáveis. Os autores concluíram que o CEACAM1 e a prolactina eram os primeiros a serem detetados com níveis significativamente alterados até 35 meses antes do diagnóstico de cancro do pâncreas. Posteriormente, até 24 meses antes do diagnóstico, são observadas mudanças no CA19-9, CEA, enolase específica dos neurónios e na gonadotrofina coriónica humana beta. Por último, níveis elevados de CA125 e IL-8 foram detetados até 12 meses antes do diagnóstico<sup>4</sup>.

Shaw et al., num estudo recente, avaliaram os níveis séricos de 27 citocinas em 241 indivíduos, 127 deles com ADP, 49 com pancreatite crónica, 20 com obstrução biliar benigna e 45 controlos saudáveis. Observaram que combinando a IL-8 com a IL-1b e o CA19-9 a sensibilidade e especificidade eram de 94% e 100%, respetivamente, para a discriminação de doentes com ADP de controlos saudáveis. Para a discriminação de doentes com ADP de doentes com doença benigna, verificaram que o conjunto formado por IL-8, proteína 10 induzida pelo interferão- $\gamma$  (do inglês IP-10 – *interferon- $\gamma$  induced protein 10*), IL-6 e fator de crescimento derivado das plaquetas (do inglês PDGF – *platelet-derived growth factor*) com o CA19-9 era mais eficaz (sensibilidade de 74,7% e especificidade de 84,8%) do que usando o CA19-9 isoladamente (sensibilidade de 58,8% e especificidade de 78,2%). Também no que diz respeito à discriminação entre o ADP e a pancreatite crónica, o conjunto formado por CA19-9, IL-6, IL-8 e IP-10 demonstrou ser mais eficaz (sensibilidade de 76,2% e especificidade de 90,9%) do que o uso do CA19-9 isoladamente (sensibilidade de 73,8% e especificidade de 78,8%)<sup>57</sup>. Estes resultados apoiam o papel potencial de citocinas específicas no diagnóstico diferencial do cancro pancreático, necessitando de estudos adicionais.

Zhang et al. analisaram 61 parâmetros séricos no soro de 183 controlos saudáveis, 129 doentes com ADP e 95 doentes com pancreatite crónica. O conjunto composto pelo CA19-9, albumina, proteína C reativa (do inglês CRP – *C Reactive Protein*) e IL-8 teve o maior valor diagnóstico para discriminar entre o ADP e os controlos saudáveis. A sensibilidade foi de

93,80% para todos os estadios, 93,10% para o estadio inicial e 94,40% para o estadio avançado do ADP. A especificidade foi de 90%. O conjunto composto pelo CA19-9, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), CRP e IL-6 teve o maior valor diagnóstico para distinguir entre o ADP e a pancreatite crónica. A sensibilidade foi de 72,10% para todos os estadios, 76,10% para o estadio inicial e 67,20% para o estadio avançado do ADP. A especificidade foi de 90%<sup>58</sup>.

**Tabela V – Associações de biomarcadores proteicos para o diagnóstico do ADP no soro**

<b>Combinações de marcadores</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Referência bibliográfica</b>
CA19-9 + CA242 + TSGF	96 doentes ADP vs 52 PC vs 200 CS	77%	100%	42
APRIL + CA19-9 + CEA	67 doentes ADP vs 55 DPB	83,6%	80%	47
APRIL + CA19-9	67 doentes ADP vs 55 DPB	88,1%	78,2%	47
CA19-9 + ICAM-1 + OPG	333 doentes ADP vs 227 CS	78%	94%	54
CA19-9 + CEA + TIMP-1	333 doentes ADP vs 144 DPB	71%	89%	54
CA19-9 + OPN + TIMP-1	86 doentes ADP vs 134 GC	87%	91%	55
CA19-9 + SYCN + REG1B	20 doentes ADP (estádios I/II) vs 92 CS	48,9%	39%	56
CA19-9 + SYCN + AGR2	20 doentes ADP (estádios I/II) vs 92 CS	31%	50%	56
CA19-9 + SYCN + LOXL2	20 doentes ADP (estádios I/II) vs 92 CS	46,7%	40%	56
CA19-9 + SYCN	20 doentes ADP (estádios I/II) vs 92 CS	45,1%	40%	56
CA19-9 + IL-1b + IL-8	127 doentes ADP vs 45 CS	94%	100%	57
CA19-9 + IL-6 + IL-8 + IP-10 + PDGF	127 doentes ADP vs 69 DPB	74,7%	84,8%	57
CA19-9 + IL-6 + IL-8 + IP-10	127 doentes ADP vs 49 PC	76,2%	90,9%	57
Alb + CA19-9 + IL-8 + CRP	129 doentes ADP vs 183 CS	93,80%	90%	58
CA19-9 + CO <sub>2</sub> + IL-6 + CRP	129 doentes ADP vs 95 PC	72,10%	90%	58

Os valores de sensibilidade e especificidade não são comparáveis, pois os estudos usaram amostras diferentes e casos de ADP em estádios diferentes. Alb, albumina; CO<sub>2</sub>, dióxido de carbono; CS, controlos saudáveis; DPB, doença pancreática benigna; GC, grupos controlo; PC, pancreatite crónica.

## **Biomarcadores metabólicos**

Embora ainda estejam a dar os primeiros passos, as tecnologias metabolómicas são uma grande promessa na descoberta de biomarcadores para o ADP, porque são mais baratas, têm um maior rendimento e reprodutibilidade em comparação com as técnicas genómicas ou proteómicas<sup>6</sup>.

A deteção preferencial de produtos finais do metabolismo tumoral no soro de doentes permite a identificação de biomarcadores com base em grupos inteiros de metabolitos tumorais que são regulados de forma positiva ou negativa<sup>6</sup>.

Um grupo de investigação observou níveis significativamente mais baixos de 3-hidroxiacetato, 3-hidroxiisovalerato, lactato e trimetilamina-N-óxido, assim como níveis significativamente mais elevados de isoleucina, triglicédeos, leucina e creatinina em doentes com ADP, comparando com controlos saudáveis<sup>59</sup>.

Num estudo mais recente, Kobayashi et al. analisaram o soro de 42 doentes com ADP, 23 doentes com pancreatite crónica e 41 controlos saudáveis. De um total de 45 metabolitos séricos detetados e avaliados, apenas 18 mostraram níveis significativamente alterados nos doentes com ADP em comparação com os controlos saudáveis. Seguidamente, dentro desses 18 metabolitos, selecionaram-se os 4 que mostraram maior eficácia diagnóstica, o xilitol, 1,5-anidro-D-glucitol, histidina e inositol, e, com base nesta combinação, tentou-se construir um modelo diagnóstico para o ADP. Combinando os 4 metabolitos, obtiveram-se valores de sensibilidade e especificidade de 71,4% e 78,1%, respetivamente. Em comparação, a sensibilidade e especificidade do CA19-9 neste estudo foi de 69% e 85,9%, respetivamente. Em relação à deteção do ADP em estadios I e II, as sensibilidades para a combinação dos 4 metabolitos e para o CA19-9 foram 77,8% e 55,6%, respetivamente. No caso da pancreatite crónica, a taxa de falsos positivos foi 17,4% e 30,4%, respetivamente. O modelo apresentado

demonstrou assim uma maior eficácia na detecção do ADP em estádios precoces do que o CA19-9<sup>60</sup>, sendo todavia necessários mais estudos.

Ritchie et al., usando uma plataforma sensível baseada na espectrometria de massa de alta resolução, analisaram amostras séricas de 40 doentes com ADP e 50 controlos saudáveis. Os autores observaram reduções significativas nos níveis séricos de metabolitos pertencentes a cinco sistemas metabólicos nos doentes com ADP, comparativamente com os controlos saudáveis. Dentro dos metabolitos alterados estavam ácidos gordos de cadeia muito longa, fosfatidilcolinas, lisofosfatidilcolinas, esfingomielinas e etanolaminas plasmalogénio contendo vinil-éter. Seguidamente, o metabolito mais discriminatório, o ácido gordo PC-594, foi avaliado no soro de 14 doentes com ADP, 6 doentes com IPMN e 40 controlos saudáveis. No que diz respeito ao PC-594, para um valor “cut-off” correlacionado com 5% de positividade em indivíduos com idade inferior a 50 anos, verificou-se uma sensibilidade de 87% e especificidade de 95%<sup>61</sup>.

### **Biomarcadores epigenéticos**

O cancro do pâncreas é uma doença que apresenta anomalias epigenéticas, assim como genéticas. O marcador epigenético mais conhecido é a metilação do ácido desoxirribonucleico (ADN). A detecção da metilação do ADN oferece várias vantagens em relação aos marcadores genéticos e séricos. Primeiro, a incidência de metilação aberrante do ADN em ilhas CpG específicas é mais elevada do que a incidência de defeitos genéticos. Segundo, a metilação aberrante do ADN nas células cancerígenas pode ser detetada com grande sensibilidade, mesmo quando está incorporada em quantidades substanciais de ADN normal contaminado. Terceiro, a detecção de metilação aberrante do ADN é tecnicamente simples, através da “*polymerase chain reaction*” (PCR) específica da metilação (do inglês MSP – *Methylation-Specific PCR*). Quarto, a metilação aberrante do ADN parece ocorrer nos estádios iniciais dos

tumores, causando uma perda e/ou ganho de função de processos-chave e de propriedades de sinalização<sup>5</sup>.

Outros marcadores epigenéticos promissores para o diagnóstico do ADP incluem a expressão aberrante dos microRNAs, a expressão aberrante das repetições de satélites e as modificações das histonas.

- **Metilação aberrante do ADN no cancro do pâncreas**

A inativação de genes supressores tumorais causada pela metilação aberrante do ADN, fenómeno que raramente ocorre nos tecidos não neoplásicos, foi inicialmente sugerida no retinoblastoma mas foi depois demonstrada em todos os tipos de cancros, incluindo o cancro pancreático. A análise da metilação de vários genes importantes relacionados com o cancro do pâncreas envolveu inicialmente o *CDKN2A*, o *MLH1* e o *CDH1*, seguindo-se-lhe a identificação de muitos outros genes relacionados com o cancro que são submetidos a metilação aberrante e desempenham um importante papel na carcinogénese pancreática; como por exemplo o *SPARC*, *DUSP6*, *RELN*, *TFPI2* e *RUNX3*<sup>5</sup>.

Sato et al. verificaram que o *RPRM*, um gene envolvido na paragem do ciclo celular em G2 induzida pelo *TP53*, estava metilado em 60% dos cancros pancreáticos e estava associado com instabilidade genética e evolução desfavorável após ressecção cirúrgica<sup>62</sup>.

Omura et al. usaram a amplificação das ilhas CpG metiladas acopladas com o promotor e os "microarrays" das ilhas CpG para identificarem padrões de metilação do ADN diferenciais no cancro do pâncreas versus pâncreas normal e descobriram haver metilação aberrante de centenas de promotores e ilhas CpG nas células pancreáticas cancerígenas<sup>63</sup>.

Recentemente, Shimizu et al. aplicaram um novo método chamado de "microarray acoplado com a ativação da transcrição das metil-CpG"<sup>64</sup> para procurarem os genes silenciados mediados pela metilação no cancro pancreático<sup>65</sup>. Dezasseis genes metilados, que

nunca tinham sido detetados pelo 5-aza-2-deoxicitidina (agente desmetilante convencional do ADN), foram identificados: *TRH*, *CYP26A1*, *TMEM204*, *GAD1*, *CSMD2*, *FRG2*, *ARC*, *SLC32A1*, *FOXJ1*, *TBX21*, *HOXA7*, *ANKRD35*, *HBA2*, *SP5*, *TNXB* e *GRASP*<sup>65</sup>. Muitos destes genes estão metilados de forma aberrante numa elevada proporção de cancros pancreáticos e podem ser detetados com análise MSP, o que faz deles candidatos atrativos para a deteção precoce do cancro do pâncreas<sup>5</sup>.

A hipometilação do genoma é também frequentemente observada nos cancros humanos, incluindo o cancro do pâncreas. Juntamente com a inativação mediada pela hipermetilação de genes que funcionam como supressores tumorais, a ativação aberrante mediada pela hipometilação de oncogenes também tem um papel importante. Um exemplo é o *S100A4*, um gene implicado na metastização, que está hipometilado em três locais CpG do primeiro intrão, fenómeno que se associa com a expressão aumentada da proteína. Outros genes frequentemente hipometilados incluem o *CLDN4*, o *LCN2*, o *SFN*, o *TFF2*, o *MSLN* e o *PSCA*, que têm a sua expressão aumentada nas células cancerígenas pancreáticas em comparação com os ductos pancreáticos normais<sup>5</sup>. Com as tecnologias de microarray de oligonucleótidos, foram detetados dois outros genes hipometilados de forma aberrante e com expressão aumentada, relacionados também com o cancro pancreático, o *S100P* e o *SERPIN5*<sup>66</sup>.

Estes marcadores metilados proporcionam uma abordagem promissora para o diagnóstico de cancro do pâncreas, podendo ser usados para examinar amostras de suco pancreático colhidas endoscopicamente de indivíduos com suspeita de doença pancreática. De facto, a análise da metilação de vários genes, incluindo o *CCND2*, *FOXE1*, *NPTX2*, *PENK*, *SFRP1*, *SPARC* e *TFPI2*, em amostras de suco pancreático, demonstrou que esta técnica pode distinguir de modo eficaz os doentes com cancro do pâncreas dos doentes com pancreatite crónica e dos que têm o pâncreas normal (Tabela VI)<sup>5</sup>.

**Tabela VI – Marcadores de metilação do ADN para diagnóstico do ADP no suco pancreático<sup>5</sup>**

Nome do Gene	Sensibilidade	Especificidade	Referência bibliográfica
<i>CCND2</i>	(9/11) 82%	(25/27) 93%	67
<i>FOXE1</i>	(8/11) 73%	(21/27) 78%	67
<i>NPTX2</i>	(10/11) 91%	(21/27) 78%	67
<i>PENK</i>	(8/11) 73%	(19/27) 70%	67
<i>SFRP1</i>	(9/11) 82%	(21/27) 78%	67
<i>SPARC</i>	(10/11) 91%	(19/27) 70%	67
<i>TFPI2</i>	(8/11) 73%	(22/27) 81%	67

Depois da descoberta da metilação anormal no cancro pancreático, seguiu-se a investigação da metilação nas lesões precursoras de ADP e rapidamente foram detetados os genes que mais frequentemente estão metilados nessas lesões. Sato et al. compararam os perfis de expressão genética globais entre as IPMNs e as células epiteliais ductais pancreáticas normais e identificaram que o gene *CDKN1C* tinha a sua expressão diminuída nas IPMNs (estava hipermetilado), havendo conseqüentemente uma redução da expressão do seu produto proteico<sup>68</sup>. Outros genes que estão frequentemente hipermetilados nas lesões precursoras foram identificados: *PENK*, *CDKN2A*, *SPARC*, *SFRP1*, *TSLC1*, *RELN*, *TFPI2*, *CLDN5* e *UCHL1* nas lesões IPMNs<sup>69</sup> e *SFRP1*, *RPRM*, *SPARC*, *CLDN5*, *LHX1*, *NPTX2*, *PENK* e *CDKN2A* nas lesões PanINs<sup>70</sup>.



Tais resultados vieram comprovar que a hipermetilação aberrante das ilhas CpG começa nas lesões precursoras iniciais como as PanINs e as IPMNs e que a sua prevalência aumenta progressivamente durante o curso da neoplasia<sup>5</sup>.

- **Os microRNAs como biomarcadores diagnósticos do ADP**

Os microRNAs (miRNAs/miRs) são pequenas moléculas endógenas de ácido ribonucleico (ARN) de cadeia simples, não codificantes, com cerca de 17 a 25 nucleótidos, que atuam como reguladores da expressão genética, ao nível da pós-transcrição, através da clivagem de um ARN mensageiro alvo e sua degradação, ou através da inibição da sua tradução. Cerca de 1000 miRNAs já foram identificados em humanos e alterações generalizadas nestes miRNAs foram identificadas em vários tipos de cancro, crendo-se que podem estar associados com a patogénese do cancro, com a apoptose e com o crescimento celular, podendo assim funcionar como supressores tumorais ou como oncogenes<sup>5,71</sup>.

De facto, estudos genéticos demonstraram que alguns miRNAs estão associados com a promoção tumoral (oncogenes), enquanto outros (supressores tumorais) inibem o tumor, reduzindo a proliferação celular, a sobrevivência e a diferenciação celular. Restabelecer a expressão destes últimos miRNAs nas células tumorais poderia promover a diferenciação e transformar as células malignas em benignas ou normais<sup>71</sup>.

A modificação epigenética, a alteração do número de cópias de ADN e as mutações genéticas poderão ser fatores que regulam a expressão dos miRNAs<sup>71</sup>.

Vários estudos recentes demonstraram que a produção de microRNAs aberrantes é um evento precoce no desenvolvimento das lesões PanINs<sup>2</sup>. Num desses estudos, Ryu et al. demonstraram que o miR-155 tem a sua expressão significativamente aumentada nas lesões PanIN-2 e PanIN-3<sup>72</sup>.

Num outro estudo, Yu et al. investigaram que vários miRNAs, incluindo miR-34c-5p, miR-129-3p, miR-130b, miR-133a, miR-148a/b, miR-151-5p, miR-185, miR-200c, miR-330-3p, miR-331-3p/5p, miR-378 e miR-423-5p, tinham a sua expressão aumentada nas PanIN-1 ou PanIN-2. Para além disso, os autores identificaram o miR-196b como sendo o miRNA significativamente mais expresso nas lesões PanIN-3 avançadas, enquanto nenhuma expressão foi vista nas lesões PanIN de baixo grau <sup>73</sup>.

Usando os perfis de expressão dos microRNAs, diferentes autores concluíram que estas moléculas poderão servir como biomarcadores para distinguir entre o tecido pancreático benigno, a pancreatite crónica e o ADP. Bloomston et al.<sup>74</sup>, através de um estudo com amostras teciduais de 65 doentes com ADP e 42 doentes com pancreatite crónica, verificaram que um aumento da expressão de miR-99, miR-100, miR-100-1/2, miR-125a, miR-125b-1, miR-199a-1 e miR-199a-2 foi observado no ADP assim como na pancreatite crónica, mas não no tecido pancreático normal. Do mesmo modo, foi descrito um aumento da expressão de miR-21, miR-221, miR-222, miR-181a, miR-181b, miR-181d e miR-155 em amostras tumorais comparativamente com o tecido pancreático benigno<sup>74</sup>.

O miR-34a tem um efeito anticancerígeno ao alterar a expressão de vários genes envolvidos na progressão do ciclo celular, na reparação do ADN, na angiogénese e na apoptose<sup>75</sup>. Sabe-se que o miR-34a e o miR-148a estão hipermetilados e reprimidos nos cancros pancreáticos. Curiosamente, a hipermetilação do miR-148a apenas foi observada nas lesões neoplásicas, nunca tendo sido observada nas lesões não neoplásicas, incluindo a pancreatite crónica<sup>76</sup>.

Foram também estudados os perfis de quatro miRNAs (o miR-21, o miR-155, o miR-196a e o miR-210) em amostras séricas de 49 doentes com ADP e 36 controlos saudáveis, tendo sido demonstrado que esta combinação de miRNAs era capaz de diferenciar o ADP do grupo de controlos saudáveis, com uma sensibilidade de 64% e uma especificidade de 89%.

Dentro destes miRNAs, a expressão elevada de miR-155 e miR196a foi observada em paralelo com a progressão da doença<sup>77</sup>.

Num estudo mais recente, foi identificada uma diminuição na expressão do miR-150 nos tecidos de cancro do pâncreas, comparativamente com o pâncreas normal, sugerindo o potencial do miR-150 na diferenciação entre amostras pancreáticas normais e cancerígenas<sup>78</sup>.

Liu et al. demonstraram, com base numa amostra tecidual de 197 casos de ADP e 158 controlos saudáveis, que a combinação miR-20a, miR-21, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-185 e miR191 permitiu distinguir os casos de ADP dos controlos saudáveis, com uma sensibilidade e especificidade médias de 94% e 93%, respetivamente<sup>79</sup>.

He XY et al., com base em amostras séricas de 97 doentes com ADP e 158 controlos saudáveis, estabeleceram um modelo de biomarcadores baseado em 7 miRNAs (miR-20a, miR-21, miR-24, miR-25, miR-99a, miR-185 e miR-191) para o diagnóstico do ADP. Estes biomarcadores tiveram alta sensibilidade e especificidade, para distinguir os diversos estadios do cancro do pâncreas de controlos saudáveis e também foram eficazes na discriminação entre doentes com cancro do pâncreas e doentes com pancreatite crónica. Em relação à deteção dos casos de ADP em estadio I, este biomarcador baseado nos 7 miRNAs atrás mencionados teve uma sensibilidade de 96,2%, sendo maior do que a do CA19-9 (46,2%), também calculada para as mesmas amostras. Relativamente à deteção dos casos de ADP em estadio II, a sensibilidade foi de 91,7%, sendo também maior do que a do CA19-9 (62,5%)<sup>80</sup>.

Para além de poderem ser detetados no tecido pancreático, no suco pancreático e no soro, um estudo avaliou os miRNAs nas fezes e detetou mais baixas concentrações de alguns miRNAs em doentes com cancro do pâncreas em comparação com doentes controlo<sup>81</sup>.

Até à data, a deteção de miRNAs não é usada como um critério para o diagnóstico do ADP<sup>83</sup>. Contudo, considerando o seu envolvimento vigoroso na iniciação cancerígena e sua progressão, tudo indica que o seu aumento de expressão (tabela VII) ou a sua diminuição

possam vir a ser utilizados como futuros marcadores de diagnóstico<sup>82</sup>. Para podermos atingir esse fim, falta, todavia, ainda classificar/categorizar os miRNAs de acordo com o estadio, o grau e a origem celular para que estes possam ser estabelecidos como biomarcadores clínicos<sup>82</sup>.

**Tabela VII- Lista dos miRNAs com expressão aumentada no ADP**

<b>MicroRNAs</b>	<b>Referências bibliográficas</b>
miR-15b, 95, 186, 190, 196a, 200b, 221 e 222	83
miR-155	84,85
miR-15b, 16-1, 21, 24-1, 92-1, 100, 107, 125b-1, 155, 181a, 212, 221, 301, 376a, 424, let-7d e let-7f-1	86
miR-10a, 10b, 21, 23a, 23b, 99, 100, 100-1/2, 103-2, 107, 125a, 125b-1, 143, 146, 155, 181a, 181b, 181b-1, 181b-2, 181c, 181d, 196a-2, 199a-1, 199a-2, 205, 213, 220, 221, 222 e 223	74
miR-21	74,84,86
miR-17, 20, 92-1, 99a, 99b, 100, 103, 107, 125a, 125b-1, 125b-2, 129-2, 130a, 132, 204, 211 e 343	87
miR-18a, 31, 93, 141, 143, 145, 146a, 150, 155, 196a, 196b, 203, 205, 210, 221, 222, 223 e 224	88
miR-17-5p, 20a, 21, 24-1, 24-2, 25, 29b-2, 30c, 92-2, 106a, 107, 128b, 146, 181b-1, 191, 199a-1, 214, 221, 223 e 323	89
miR-376	90

- **A expressão aberrante das repetições de satélites no cancro do pâncreas**

A heterocromatina é composta por repetições de satélites, que são repetições de ADN agrupadas nas regiões adjacentes aos centrómeros, ocorrendo “in tandem” (isto é, o início de

uma repetição ocorre imediatamente a seguir ao fim de outra). As repetições de satélites são transcritas em ARNs não codificantes e estão ligadas ao silenciamento genético e à manutenção da integridade cromossômica. Estas sequências repetitivas de ADN geneticamente inativo são necessárias nos ratinhos para a formação do complexo do fuso mitótico e para a segregação fiel dos cromossomas. Porém, os humanos também têm repetições de satélites que se dividem em múltiplas classes e têm funções semelhantes às descritas nos ratinhos<sup>5</sup>. Ting et al. mostraram que os satélites transcritos têm a sua expressão aumentada nos cancros epiteliais dos ratos e dos humanos<sup>91</sup>. Neste estudo foi ainda demonstrado que, nos ADPs, todos os 15 doentes analisados apresentavam valores elevados de transcrição do ADN satélite alfa e as transcrições do satélite *HSATII* foram altamente específicas para cancro<sup>91</sup>. Padrões semelhantes foram observados nos cancros do pulmão, rim, ovário, cólon e da próstata. O aumento da expressão de satélites transcritos no cancro pode refletir alterações globais no silenciamento da heterocromatina, com alterações dos mecanismos de metilação do ADN e de modificação das histonas que levaram à instabilidade genómica e ao processo cancerígeno<sup>91</sup>. A deteção de uma expressão aberrante de repetições de satélites poderá, assim, ser potencialmente útil como biomarcador para a deteção de cancro<sup>5</sup>.

Num estudo mais recente, Laghi et al. testaram a presença de um conjunto de repetições de 5 mononucleótidos (*Bat26*, *Bat25*, *NR-21*, *NR-24* e *NR-27*) em 338 amostras teciduais de doentes com ADP esporádico. Apenas uma amostra tecidual de ADP (0,3%) mostrou instabilidade de microssatélites em todas as repetições de mononucleótidos testadas. Os autores concluíram que a prevalência de instabilidade de microssatélites no ADP esporádico era desprezível<sup>92</sup>.

- **Modificações das histonas no cancro pancreático**

As histonas são pequenas proteínas básicas responsáveis pela compactação do ADN e pela manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina. As modificações das histonas, juntamente com a metilação do ADN, também afetam a estrutura da cromatina local e estão envolvidas na regulação da transcrição genética e de outros processos como a reparação e a replicação do ADN. No geral, o promotor da hipermetilação das ilhas CpG nas células cancerígenas está associado com uma combinação particular de modificações das histonas: a desacetilação das histonas H3 e H4, a perda da trimetilação da histona H3 lisina 4, o ganho da metilação da histona H3 lisina 9 e a trimetilação da histona H3 lisina 27. É também sabido que alguns genes com propriedades de supressão tumoral, como o *p21<sup>WAF1</sup>*, são silenciados ao nível da transcrição, na ausência de hipermetilação das ilhas CpG, quando as histonas H3 e H4 hipoacetiladas e hipermetiladas estão presentes<sup>5</sup>.

As alterações globais e específicas dos padrões de modificação das histonas têm sido relatadas como sendo características do processo de carcinogénese. Estas alterações são, em parte, devidas a anomalias nas proteínas modificadoras das histonas<sup>5</sup>. Embora pouco se saiba sobre os padrões de perturbação da modificação das histonas nos cancros humanos, o aumento da expressão do potenciador de zeste homólogo 2 (do inglês EZH2 – *enhancer of zeste homologue 2*), a metiltransferase da histona H3 lisina 27, foi observado numa grande variedade de tumores, incluindo o cancro do pâncreas<sup>93</sup>. EZH2 é um membro do grupo polycomb (grupo de proteínas capazes de metilarem tanto o ADN como as histonas) e tem como função regular diretamente a transcrição de vários genes envolvidos nos cancros humanos, pela metilação e desacetilação das histonas<sup>94</sup>. Toll et al. analisaram a expressão do EZH2 e da E-caderina teciduais em 54 casos de ADP, 13 IPMNs e 6 casos de pancreatite crónica. Verificaram que o aumento da expressão do EZH2 no cancro pancreático está associado com uma diminuição da regulação da expressão da E-caderina e com um aumento

do tamanho tumoral<sup>94</sup>. Para além disso, foi demonstrado que a expressão do EZH2 é significativamente mais elevada nas IPMNs malignas do que nas benignas e que na pancreatite crónica os seus níveis de expressão foram baixos ou mesmo negativos<sup>94</sup>. Num estudo mais recente, analisaram-se os níveis de miR-101 e EZH2 em várias linhas celulares de ADP e IPMNs. Verificou-se que um nível reduzido de miR-101 pode contribuir para o aumento da expressão do EZH2 nas IPMNs malignas<sup>95</sup>. Estes factos sugerem que o aumento da expressão do EZH2 pode desempenhar um papel importante na fase inicial do desenvolvimento de neoplasias.

Os padrões de modificação das histonas no cancro do pâncreas vão ser analisados ao longo dos próximos anos para avaliar o seu potencial uso no diagnóstico<sup>5</sup>.

### **Células Tumorais Circulantes**

As metástases resultam da migração das células tumorais do local onde se formou o tumor primário para órgãos distantes como o pulmão, o fígado, os ossos ou o cérebro e são diretamente responsáveis pela maioria das mortes relacionadas com o cancro<sup>96</sup>.

As células tumorais circulantes (CTCs) são células de tumores que circulam através de vasos e capilares normais e através de neovasos formados pela angiogénese tumoral. Elas começam a disseminar-se para o sangue periférico nos estádios pré-invasivos e precoces do cancro do pâncreas. Uma vez que elas se difundem para o sangue periférico de doentes com cancro, também sofrem apoptose pelo sistema imunológico do corpo. De facto, as CTCs estão tipicamente presentes em baixas concentrações na corrente sanguínea dos doentes com cancro<sup>97</sup>.

As atuais abordagens para a deteção das CTCs nos doentes com cancro do pâncreas incluem os ensaios imunológicos que utilizam anticorpos dirigidos contra o antigénio da superfície celular, os ensaios moleculares baseados na PCR para extração de ADN ou ARN

tumoral das CTCs e as tecnologias baseadas nas propriedades físicas ou biológicas das células cancerígenas.

Uma limitação dos ensaios imunológicos à base de anticorpos é a potencial perda de algumas subpopulações de CTCs que não expressem os antígenos específicos usados no protocolo de captura, o que torna este método incapaz de englobar toda a população de CTCs. De facto as CTCs mais invasivas podem perder os seus antígenos epiteliais pelo processo de transição epitélio-mesenquimatoso. Isto sugere que a deteção das CTCs não poderá basear-se apenas na expressão de marcadores epiteliais, como as citoqueratinas. No entanto, pensa-se que o processo inverso (a transição de mesenquimatoso para epitelial) permita o crescimento destas células em locais distantes. Estas novas descobertas podem ajudar a explicar o mecanismo de metastização das CTCs e aperfeiçoar a identificação de CTCs metastáticas<sup>97</sup>.

No que respeita às abordagens baseadas na PCR, o principal obstáculo à sua utilização é o facto de a origem dos ácidos nucleicos não ser clara e os resultados poderem não representar CTCs atuais. Na verdade, os ácidos nucleicos podem também incluir células necróticas de depósitos tumorais, exossomas derivados de tumor, fragmentos celulares ou serem o resultado da lise de CTCs na corrente sanguínea. Esta limitação pode ser ultrapassada através da realização de uma purificação inicial das células nucleadas da circulação, seguida pela extração dos ácidos nucleicos das células antes de se realizar a PCR em tempo real (do inglês, RT-PCR – *real time-PCR*)<sup>96</sup>.

Estes métodos, ao permitirem a identificação e análise molecular das características malignas das CTCs em doentes com tumores pancreáticos pré-invasivos, podem ser úteis para a descoberta de novos marcadores biológicos para o diagnóstico precoce do cancro do pâncreas<sup>97</sup>.

As CTCs poderiam ajudar no diagnóstico de cancro pancreático metastático, substituindo a “biopsia em tempo real”, especialmente nos casos em que o tumor primário seja pequeno,



em que nem sequer seja aparente nos exames de imagem, ou nos casos em que nem a lesão metastática nem a lesão primária sejam acessíveis para biópsia<sup>96</sup>.

Outra aplicabilidade das CTCs seria nos casos em que os médicos não têm a certeza de quais os doentes com tumores pancreáticos pré-invasivos que devem ser submetidos a cirurgia curativa. Nestes doentes, a deteção de CTCs malignas poderia indicar um elevado risco de desenvolverem cancro pancreático, sendo a cirurgia curativa necessária.

Os métodos de diagnóstico de rotina, como os marcadores tumorais, a radiografia e outros não proporcionam informação citomorfológica conclusiva relacionada com a carcinogénese da doença. E porque uma história familiar de cancro pancreático é importante para esta doença, o rastreio de CTCs em indivíduos com fatores de risco familiares para o ADP pode vir a constituir uma nova ferramenta para o diagnóstico precoce do cancro do pâncreas<sup>97</sup>. No entanto, o alto custo associado à sua deteção constitui um obstáculo relevante à sua aplicabilidade clínica<sup>80</sup>.

## **Discussão**

Ao longo das últimas décadas, tem sido difícil encontrar um exame complementar de diagnóstico que seja de baixo custo e minimamente invasivo para conseguir detetar precocemente o ADP e tenha ainda a capacidade de o diferenciar de outras neoplasias ou de outras lesões benignas do pâncreas. Para além disso, também existem ainda muitas questões relativamente a quem é que deve ser submetido ao rastreio do cancro do pâncreas. Visto que o rastreio em indivíduos assintomáticos e sem fatores de risco é inviável, de acordo com o Consórcio Internacional de Rastreio do Cancro do Pâncreas de 2013, recomenda-se o rastreio de doentes com predisposição genética ou história familiar de cancro do pâncreas em parentes de primeiro ou segundo grau, através da ecoendoscopia e/ou RM/CPRM. No entanto, falta

definir a idade de início do programa de rastreio, a sua regularidade temporal e como monitorizar os doentes em que se detetem lesões pancreáticas benignas<sup>24</sup>.

Quando há suspeita de cancro do pâncreas, de entre todos os métodos de diagnóstico que se referem neste artigo, aqueles que são utilizados na prática clínica para diagnosticar o ADP são os exames imagiológicos (principalmente a ecografia, a TC e a EUS-FNA) e a pesquisa do CA19-9 no soro.

No entanto, estes métodos estão longe de serem os ideais para serem recomendados, quer seja no rastreio do ADP quer seja quando se suspeita de ADP por combinação de vários fatores clínicos de risco, pois não são sensíveis nem específicos o suficiente para diagnosticarem o ADP em estadios precoces.

Os exames imagiológicos como a ecografia, a TC e a RM, apesar de serem minimamente invasivos, não permitem visualizar lesões pancreáticas com menos de 1 cm (lesões precoces de ADP) e não são capazes de diferenciar as lesões benignas das malignas. A EUS-FNA permite visualizar lesões pancreáticas sub-centimétricas e, através da biopsia, diferenciar as lesões benignas das malignas, mas tem a desvantagem de ser invasiva, poder dar complicações e ser dependente do operador. Para além disso, todos estes exames de imagem têm uma alta taxa de falsos positivos<sup>3</sup>.

Embora algumas “guidelines”<sup>38,40</sup> clínicas não recomendem o CA19-9 como marcador no diagnóstico do cancro do pâncreas, a realidade é que há poucas alternativas, o que leva muitos médicos a valorizarem este marcador, acompanhado pelas técnicas de imagem. De facto, o CA19-9 tem muitas limitações, sendo urgente descobrir um biomarcador que seja mais específico e sensível para detetar o ADP nos seus estadios iniciais, onde a resseção cirúrgica pode assumir intenções curativas. Nesse sentido, vários estudos têm sido feitos, tendo-se encontrado potenciais biomarcadores genéticos, proteicos, metabólicos, epigenéticos e ainda a pesquisa das CTCs no soro.

No que respeita ao custo, os biomarcadores metabólicos são os mais baratos, tendo maior rendimento e reprodutibilidade em comparação com os genéticos e os proteicos. Aqueles que têm um custo mais elevado são as CTCs, pois o seu método de extração do sangue periférico é muito complexo e dispendioso. No que diz respeito à obtenção de um método de diagnóstico que seja pouco invasivo, todos aqueles biomarcadores que possam ser obtidos dos líquidos biológicos vão ser mais vantajosos, pois a colheita de material a analisar é fácil de se obter e existe um menor risco de complicações. Neste aspeto, tanto os biomarcadores proteicos, como os metabólicos, epigenéticos, as CTCs e alguns dos biomarcadores genéticos são minimamente invasivos. Relativamente à capacidade para diferenciarem lesões benignas de lesões malignas do pâncreas, também vários biomarcadores genéticos (por exemplo *KRAS* e *DJ-1*), proteicos (por exemplo OPN, S100P e Plectina-1) e epigenéticos (por exemplo o miR21 e o miR155) apresentaram resultados promissores em vários estudos. No que diz respeito à deteção do ADP em estádios precoces, houve igualmente resultados favoráveis em vários estudos relativos a biomarcadores genéticos (por exemplo *KRAS* e *CDKN2A*), proteicos (por exemplo OPN, PAM4, Plectina-1 e TSGF), metabólicos e epigenéticos (por exemplo miR-155, miR-185, miR-378). Em relação à especificidade para as lesões pancreáticas, a maioria dos biomarcadores referidos também pode apresentar valores elevados noutras patologias extra-pancreáticas, não tendo por isso grande especificidade.

No sentido de melhorar todos estes parâmetros têm-se atualmente analisado combinações de marcadores, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico do ADP. Apesar dos resultados promissores apresentados por muitos destes potenciais biomarcadores para o cancro do pâncreas, com muitos deles a apresentarem sensibilidade e especificidade para o diagnóstico superiores às apresentadas pelo CA19-9, falta a sua validação e verificação.

De facto, embora muitos novos biomarcadores sejam constantemente descobertos, muito poucos poderão vir a ser clinicamente úteis. Os problemas e dificuldades encontrados na descoberta de biomarcadores e na sua validação são abundantes e não devem ser subestimados quando se projetam estratégias e estudos experimentais. Os investigadores devem certificar-se de que usam amostras clínicas claramente definidas, grupos de controlo apropriados, que incluam um grande número de amostras, e que a manipulação da amostra seja padronizada, de modo a serem gerados dados confiáveis.

## **Conclusão**

Apesar dos recentes avanços na compreensão das alterações histológicas e moleculares iniciais que ocorrem nas lesões precursoras e no ADP, este continua a ser um dos cancros mais difíceis de tratar, tendo um mau prognóstico. Como tal, a deteção precoce do ADP é a melhor maneira de tentar curá-lo, pois permite a sua resseção cirúrgica, apesar de haver recidiva em 95% dos casos cerca de 2 anos após a resseção<sup>98</sup>.

Até ao momento, apenas a imagiologia e os valores do CA19-9 são utilizados para tentar detetar lesões neoplásicas pancreáticas iniciais nos indivíduos sintomáticos ou com fatores de risco para ADP.

Como os métodos atuais não são eficazes no diagnóstico precoce, são necessários métodos de imagem mais avançados, assim como testes sanguíneos que detetem moléculas, proteínas, células tumorais, genes ou biomarcadores epigenéticos específicos do ADP. Vários dos biomarcadores descritos neste artigo mostraram-se promissores no que respeita ao diagnóstico precoce do ADP. No entanto, são necessários mais estudos para que estes possam ter aplicabilidade clínica.

## Índice

Resumo.....	1
Abstract .....	2
Introdução.....	3
Materiais e Métodos .....	5
Evolução e Progressão do ADP .....	5
Estadiamento do ADP .....	9
Limitação do quadro clínico no diagnóstico precoce do ADP.....	10
Quem rastrear? .....	11
O papel da imagiologia no diagnóstico precoce do ADP.....	14
Biomarcadores genéticos.....	17
• KRAS .....	18
• CDKN2A/p16 <sup>INK4A</sup> .....	18
• TP53 .....	19
• SMAD4 .....	20
• DJ-1 .....	20
Biomarcadores proteicos .....	21
• CEA.....	21
• CA19-9.....	22
• Outros biomarcadores proteicos .....	24
• Associações de biomarcadores proteicos .....	30
Biomarcadores metabólicos .....	36
Biomarcadores epigenéticos.....	37
• Metilação aberrante do ADN no cancro do pâncreas .....	38
• Os microRNAs como biomarcadores diagnósticos do ADP .....	41
• A expressão aberrante das repetições de satélites no cancro do pâncreas.....	44

• Modificações das histonas no cancro pancreático.....	46
Células Tumorais Circulantes .....	47
Discussão.....	49
Conclusão .....	52
Lista de Acrónimos .....	55
Agradecimentos.....	58
Referências bibliográficas .....	59

## **Lista de Acrónimos**

ADN – ácido desoxirribonucleico

ADP – adenocarcinoma ductal pancreático

AGR2 – proteína 2 homóloga do gradiente anterior (*anterior gradient protein 2 homolog*)

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

Alb – Albumina

APRIL – ligando indutor da proliferação (*proliferation-inducing ligand*)

ARN – ácido ribonucleico

CA – antígeno dos hidratos de carbono (*carbohydrate antigen*)

CEA – antígeno carcinoembrionário (*carcinoembryonic antigen*)

CEACAM1 – molécula de adesão celular tipo 1 relacionada com o antígeno carcinoembrionário (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*)

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CPRE – colangiopancreatografia retrógrada endoscópica

CPRM – colangiopancreatografia por ressonância magnética

CRP – proteína C reativa (*C Reactive Protein*)

CS – controlos saudáveis

CTCs – células tumorais circulantes

DPB – doença pancreática benigna

EGFR – recetor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*)

EUS-FNA – punção aspirativa por agulha fina guiada por ecoendoscopia (*endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration*)

EZH2 – potenciador de zeste homólogo 2 (*enhancer of zeste homologue 2*)

FDA – *Food and Drug Administration*

GC – grupo controlo

HER2 – recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor 2*)

HSP70 – proteína do choque térmico 70 (*heat shock protein 70*)

hTERT – transcriptase reversa da telomerase humana (*human telomerase reverse transcriptase*)

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

IL-1RA – antagonista do recetor da IL-1

IMC – índice de massa corporal

IP-10 – proteína 10 induzida pelo interferão- $\gamma$  (*interferon- $\gamma$  induced protein 10*)

IPMN – neoplasias mucinosas papilares intraductais (*intraductal papillary mucinous neoplasm*)

LOXL2 – lisil oxidase-like 2 (*lysyl oxidase-like 2*)

MCN – neoplasias císticas mucinosas (*mucinous cystic neoplasms*)

MeSH – *Medical Subject Headings*

MIC-1 – citocina 1 inibidora dos macrófagos (*macrophage inhibitory cytokine-1*)

miRNA/miR – microRNA

MSP – PCR específica da metilação (*Methylation-Specific PCR*)

NEC – neoplasias epiteliais comuns

OPG – osteoprotegerina (*osteoprotegerin*)

OPN – osteopontina

PAM4 – anticorpo monoclonal anti-mucina 1

PanIN – neoplasias intraepiteliais pancreáticas (*pancreatic intraepithelial neoplasia*)

PC – pancreatite crónica



PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas (*platelet-derived growth factor*)

REG1B – fator 1 beta de regeneração dos ilhéus de Langerhans (*regenerating islet-derived 1 beta*)

RM – ressonância magnética

RT-PCR – PCR em tempo real (*real-time PCR*)

SDP – suspeita de doença pancreática

SYNC – sincolina (*syncollin*)

TC – tomografia computadorizada

TGF- $\beta$  – fator de crescimento transformante beta (*transforming growth factor beta*)

TIMP-1 – inibidor tecidual da metaloproteinase tipo 1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase type 1*)

TNF – fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

TSGF – fator de crescimento específico do tumor (*tumor specific growth factor*)

ULBP2 – proteína 2 ligante da UL16 (*UL16 binding protein 2*)

## **Agradecimentos**

Muito especialmente desejo agradecer aos meus orientadores Professora Doutora Anabela Mota Pinto e Mestre Rui Gradiz pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo.

À Dr.<sup>a</sup> Helena Donato, diretora do Serviço de Documentação, agradeço a formação na área de pesquisa bibliográfica, tendo sido uma grande ajuda na recolha de material para a elaboração desta dissertação.

Aos meus pais e namorado estou grata pelo incentivo, a compreensão e o encorajamento presentes durante todo o período de realização deste trabalho.

## Referências bibliográficas

1. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, et al. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol.* 2015;1-8. doi:10.1093/annonc/mdv001.
2. Herreros-Villanueva M, Gironella M, Castells A, Bujanda L. Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clin Chim Acta.* 2013;418:22-29. doi:10.1016/j.cca.2012.12.025.
3. Poruk KE, Firpo MA, Adler DG, Mulvihill SJ. Screening for Pancreatic Cancer. *Ann Surg.* 2012;1.
4. Nolen BM, Brand RE, Prosser D, et al. Prediagnostic serum biomarkers as early detection tools for pancreatic cancer in a large prospective cohort study. *PLoS One.* 2014;9(4):e94928. doi:10.1371/journal.pone.0094928.
5. Fukushige S, Horii A. Road to early detection of pancreatic cancer: Attempts to utilize epigenetic biomarkers. *Cancer Lett.* 2014;342(2):231-237. doi:10.1016/j.canlet.2012.03.022.
6. Datta J, Vollmer CM. Investigational biomarkers for pancreatic adenocarcinoma: where do we stand? *South Med J.* 2014;107(4):256-263. doi:10.1097/SMJ.0000000000000088.
7. Tewari N, Lobo DN. Pancreatic cancer. *Surg.* 2013;31(6):286-294. doi:10.1016/j.mpsur.2013.04.003.
8. Chakraborty S, Baine MJ, Sasson AR, Batra SK. Current status of molecular markers for early detection of sporadic pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1815(1):44-64. doi:10.1016/j.bbcan.2010.09.002.
9. Murtaugh LC, Leach SD. A case of mistaken identity? Nonductal origins of pancreatic “ductal” cancers. *Cancer Cell.* 2007;11(3):211-213. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.020.
10. Takaori K. Current understanding of precursors to pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2007;14:217-223. doi:10.1007/s00534-006-1165-6.
11. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 2010;467(7319):1114-1117.
12. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* 2012;148:349-361. doi:10.1016/j.cell.2011.11.025.
13. Edge SB, Byrd DR, Compton CC et al. Exocrine and endocrine pancreas. *AJCC Cancer Staging Man 7th ed New York.* 2010.

14. Porta M, Fabregat X, Malats N, et al. Exocrine pancreatic cancer: Symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol*. 2005;7:189-197. doi:10.1007/BF02712816.
15. Howlader N, Noone A, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review 1975-2008 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2008 National Cancer Institute. *Cancer*. 2011;2006:1992-2008. <http://www.mendeley.com/research/cancer-breast-seer-stat-fact-sheets/>.
16. Li D, Morris J, Liu J, Hassan M. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA J ...*. 2009;301(24):2553-2562. doi:10.1001/jama.2009.886.Body.
17. Vrieling A, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, et al. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2010;126:2394-2403. doi:10.1002/ijc.24907.
18. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, De Andrade M, Petersen GM. Probability of pancreatic cancer following diabetes: A population-based study. *Gastroenterology*. 2005;129(2):504-511. doi:10.1016/j.gastro.2005.05.007.
19. Canto MI, Goggins M, Hruban RH, et al. Screening for early pancreatic neoplasia in high-risk individuals: a prospective controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(6):766-781; quiz 665. doi:10.1016/j.cgh.2006.02.005.
20. 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;24:349-358. doi:10.1016/j.bpg.2010.02.007.
21. Bradley MC, Hughes CM, Cantwell MM, Napolitano G, Murray LJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pancreatic cancer risk: a nested case-control study. *Br J Cancer*. 2010;102(9):1415-1421. doi:10.1038/sj.bjc.6605636.
22. Permuth-Wey J, Egan KM. Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: Results from a systematic review and meta-analysis. *Fam Cancer*. 2009;8:109-117. doi:10.1007/s10689-008-9214-8.
23. Hruban RH, Canto MI, Goggins M, Schulick R, Klein AP. Update on familial pancreatic cancer. *Adv Surg*. 2010;44(1):293-311.
24. Canto MI, Harinck F, Hruban RH, et al. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut*. 2013;62:339-347. doi:10.1136/gutjnl-2012-303108.
25. Hewitt MJ, McPhail MJW, Possamai L, Dhar A, Vlavianos P, Monahan KJ. EUS-guided FNA for diagnosis of solid pancreatic neoplasms: A meta-analysis. *Gastrointest Endosc*. 2012;75:319-331. doi:10.1016/j.gie.2011.08.049.

26. Hébert-Magee S, Bae S, Varadarajulu S, et al. The presence of a cytopathologist increases the diagnostic accuracy of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration cytology for pancreatic adenocarcinoma: A meta-analysis. *Cytopathology*. 2013;24:159-171. doi:10.1111/cyt.12071.
27. Polkowski M, Larghi a, Vilmann P, Giovannini M, Heresbach D, Pujol B. Indications , results , and clinical impact of endoscopic ultrasound ( EUS ) -guided sampling in gastroenterology : European Society of Gastrointestinal Endoscopy ( ESGE ) Clinical Guideline. *Endoscopy*. 2011;2011(March):897-909.
28. Missiaglia E, Blaveri E, Terris B, et al. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Int J Cancer*. 2004;112:100-112. doi:10.1002/ijc.20376.
29. Parker L a, Lumbreras B, Lopez T, Hernández-Aguado I, Porta M. How useful is it clinically to analyse the K-ras mutational status for the diagnosis of exocrine pancreatic cancer? A systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(7):793-805. doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02495.x.
30. Salek C, Benesova L, Zavoral M. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration. *World J ...* 2007;13(27):3714-3720. <http://europepmc.org/articles/pmc4250643>. Accessed February 12, 2015.
31. Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 2005;7:17-23. doi:10.1593/neo.04445.
32. Herreros-Villanueva M, Rodrigo M, Claver M, et al. KRAS, BRAF, EGFR and HER2 gene status in a Spanish population of colorectal cancer. *Mol Biol Rep*. 2011;38:1315-1320. doi:10.1007/s11033-010-0232-x.
33. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, et al. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev*. 2006;20:3130-3146. doi:10.1101/gad.1478706.
34. He XY, Liu BY, Yao WY, et al. Serum DJ-1 as a diagnostic marker and prognostic factor for pancreatic cancer. *J Dig Dis*. 2011;12:131-137. doi:10.1111/j.1751-2980.2011.00488.x.
35. Goonetilleke KS, Siriwardena a K. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33(3):266-270. doi:10.1016/j.ejso.2006.10.004.
36. Duraker N, Hot S, Polat Y, Höbek A, Gençler N, Urhan N. CEA, CA 19-9, and CA 125 in the differential diagnosis of benign and malignant pancreatic diseases with or without jaundice. *J Surg Oncol*. 2007;95(2):142-147.

37. Chan A, Diamandis E, Blasutig I. Strategies for discovering novel pancreatic cancer biomarkers. *J Proteomics*. 2013;126-134. doi:10.1016/j.jprot.2012.09.025.Strategies.
38. Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:5313-5327. doi:10.1200/JCO.2006.08.2644.
39. Goggins M. Markers of pancreatic cancer: Working toward early detection. *Clin Cancer Res*. 2011;17:635-637. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3074.
40. Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R, et al. Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Ann Oncol*. 2010;21:441-447. doi:10.1093/annonc/mdp332.
41. Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R. Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer*. 2004;101:2727-2736. doi:10.1002/cncr.20672.
42. Jiang JT, Wu CP, Deng HF, et al. Serum level of TSGF, CA242 and CA19-9 in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2004;10:1675-1677.
43. Ni XG, Bai XF, Mao YL, et al. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31:164-169. doi:10.1016/j.ejso.2004.09.007.
44. Koopmann J, Fedarko NS, Jain A, et al. Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:487-491.
45. Simeone DM, Ji B, Banerjee M, et al. CEACAM1, a novel serum biomarker for pancreatic cancer. *Pancreas*. 2007;34:436-443. doi:10.1097/MPA.0b013e3180333ae3.
46. Gold D V., Goggins M, Modrak DE, et al. Detection of early-stage pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:2786-2794. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0667.
47. Wang F, Chen L, Ding W, et al. Serum APRIL, a potential tumor marker in pancreatic cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:1715-1719. doi:10.1515/CCLM.2011.608.
48. Bausch D, Thomas S, Mino-Kenudson M, et al. Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17:302-309. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0999.
49. Chang YT, Wu CC, Shyr YM, et al. Secretome-based identification of ULBP2 as a novel serum marker for pancreatic cancer detection. *PLoS One*. 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0020029.
50. Dutta SK, Girotra M, Singla M, et al. Serum HSP70: A Novel Biomarker for Early Detection of Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2012;41:530-534. doi:10.1097/MPA.0b013e3182374ace.

51. Wang X, Li Y, Tian H, et al. Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a novel diagnostic serum biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2014;1:1-11.
52. Ohuchida K, Mizumoto K, Egami T, et al. S100P is an early developmental marker of pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5411-5416. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0298.
53. Nakashima A, Murakami Y, Uemura K, et al. Usefulness of human telomerase reverse transcriptase in pancreatic juice as a biomarker of pancreatic malignancy. *Pancreas*. 2009;38:527-533. doi:10.1097/MPA.0b013e3181a16d28.
54. Brand RE, Nolen BM, Zeh HJ, et al. Serum biomarker panels for the detection of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17:805-816. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0248.
55. Poruk KE, Firpo MA, Scaife CL, et al. Serum osteopontin and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2013;42:193-197. doi:10.1097/MPA.0b013e31825e354d.
56. Makawita S, Dimitromanolakis A, Soosaipillai A, et al. Validation of four candidate pancreatic cancer serological biomarkers that improve the performance of CA19.9. *BMC Cancer*. 2013;13(1):404. doi:10.1186/1471-2407-13-404.
57. Shaw VE, Lane B, Jenkinson C, et al. Serum cytokine biomarker panels for discriminating pancreatic cancer from benign pancreatic disease. *Mol Cancer*. 2014;13(1):114. doi:10.1186/1476-4598-13-114.
58. Zhang P, Zou M, Wen X, et al. Development of serum parameters panels for the early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2014;134:2646-2655. doi:10.1002/ijc.28584.
59. OuYang D, Xu J, Huang H, Chen Z. Metabolomic Profiling of Serum from Human Pancreatic Cancer Patients Using 1H NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011:1-7.
60. Kobayashi T, Nishiumi S, Ikeda A, et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(11):571-579. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-1033.
61. Ritchie S a, Akita H, Takemasa I, et al. Metabolic system alterations in pancreatic cancer patient serum: potential for early detection. *BMC Cancer*. 2013;13:416. doi:10.1186/1471-2407-13-416.
62. Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Goggins M. Aberrant methylation of Reprimo correlates with genetic instability and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*. 2006;107:251-257. doi:10.1002/cncr.21977.

63. Omura N, Li CP, Li A, et al. Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:1146-1156. doi:10.4161/cbt.8.4.8156.
64. Sato Y, Horii A, Fukushige S. Microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation (MeTA-array) identifies hypermethylated genes containing the stringent criteria of CpG islands at high frequency. *Epigenetics.* 2011;6:752-759. doi:10.4161/epi.6.6.15906.
65. Shimizu H, Horii A, Sunamura M, et al. Identification of epigenetically silenced genes in human pancreatic cancer by a novel method “microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation” (MeTA-array). *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;411:162-167. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.121.
66. Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Goggins M. Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene.* 2004;23:1531-1538. doi:10.1038/sj.onc.1207269.
67. Matsubayashi H, Canto M, Sato N, et al. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res.* 2006;66:1208-1217. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2664.
68. Sato N, Matsubayashi H, Abe T, Fukushima N, Goggins M. Epigenetic Down-Regulation of CDKN1C / p57KIP2 in Pancreatic Ductal Neoplasms Identified by Gene Expression Profiling. *Hum Cancer Biol.* 2005;11(13):4681-4689.
69. Hong S-M, Kelly D, Griffith M, et al. Multiple genes are hypermethylated in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol.* 2008;21:1499-1507. doi:10.1038/modpathol.2008.157.
70. Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol.* 2008;21:238-244. doi:10.1038/modpathol.3800991.
71. Rachagani S, Kumar S, Batra SK. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 2010;292(1):8-16. doi:10.1016/j.canlet.2009.11.010.
72. Ryu JK, Hong SM, Karikari CA, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A. Aberrant microRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology.* 2010;10:66-73. doi:10.1159/000231984.
73. Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res.* 2012;18:981-992. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2347.
74. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA.* 2007;297:1901-1908. doi:10.1016/S0739-5930(08)70061-8.



75. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26:745-752. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.010.
76. Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, et al. The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin Chem*. 2010;56:1107-1118. doi:10.1373/clinchem.2010.144709.
77. Wang J, Chen J, Chang P, et al. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(9):807-813. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0094.
78. Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, et al. MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*. 2011;32:1832-1839. doi:10.1093/carcin/bgr223.
79. Liu R, Chen X, Du Y, et al. Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clin Chem*. 2012;58:610-618. doi:10.1373/clinchem.2011.172767.
80. He X-Y, Yuan Y-Z. Advances in pancreatic cancer research: moving towards early detection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(32):11241-11248. doi:10.3748/wjg.v20.i32.11241.
81. Link A, Becker V, Goel A, Wex T, Malfertheiner P. Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer. *PLoS One*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0042933.
82. Srivastava SK, Arora S, Singh S, Bhardwaj A, Averett C, Singh AP. MicroRNAs in pancreatic malignancy: Progress and promises. *Cancer Lett*. 2014;347:167-174. doi:10.1016/j.canlet.2014.02.015.
83. Zhang Y, Li M, Wang H, et al. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J Surg*. 2009;33:698-709. doi:10.1007/s00268-008-9833-0.
84. Habbe N, Koorstra JBM, Mendell JT, et al. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther*. 2009;8:340-346. doi:10.4161/cbt.8.4.7338.
85. Gironella M, Seux M, Xie M-J, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:16170-16175. doi:10.1073/pnas.0703942104.
86. Eun JL, Gusev Y, Jiang J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2007;120:1046-1054. doi:10.1002/ijc.22394.
87. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic

- features and clinical behavior. *J Clin Oncol.* 2006;24:4677-4684. doi:10.1200/JCO.2005.05.5194.
88. Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene.* 2007;26:4442-4452. doi:10.1038/sj.onc.1210228.
  89. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2257-2261. doi:10.1073/pnas.0510565103.
  90. Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:5394-5403. doi:10.1093/nar/gki863.
  91. Ting DT, Lipson D, Paul S, et al. Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science.* 2011;331:593-596. doi:10.1126/science.1200801.
  92. Laghi L, Beghelli S, Spinelli A, et al. Irrelevance of Microsatellite Instability in the Epidemiology of Sporadic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS One.* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0046002.
  93. Ougolkov A V., Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6790-6796. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1013.
  94. Toll AD, Dasgupta A, Potoczek M, et al. Implications of enhancer of zeste homologue 2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2010;41:1205-1209. doi:10.1016/j.humpath.2010.03.004.
  95. Nakahara O, Takamori H, Iwatsuki M, et al. Carcinogenesis of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: Loss of MicroRNA-101 Promotes Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2. *Ann Surg Oncol.* 2012;19:565-571. doi:10.1245/s10434-011-2068-6.
  96. Cen P, Ni X, Yang J, Graham DY, Li M. Circulating tumor cells in the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(2):350-356. doi:10.1016/j.bbcan.2012.05.007.
  97. Ren C, Chen H, Han C, et al. Detection and molecular analysis of circulating tumor cells for early diagnosis of pancreatic cancer. *Med Hypotheses.* 2013;80(6):833-836. doi:10.1016/j.mehy.2013.03.027.
  98. Barugola G, Falconi M, Bettini R, et al. The determinant factors of recurrence following resection for ductal pancreatic cancer. *JOP.* 2007;8:132-140.