

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS NO CÂNCER DE PÂNCREAS  
POR IMUNOHISTOQUÍMICA TISSUE MICROARRAY**

**CAMILA JULIANO SALVADOR RODRIGUES**

Porto Alegre  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS NO CÂNCER DE PÂNCREAS  
POR IMUNOHISTOQUÍMICA TISSUE MICROARRAY**

**CAMILA JULIANO SALVADOR RODRIGUES**

Orientador: Prof. Dr. Marino Muxfeldt Bianchin  
Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Medicina:  
Ciências Médicas, da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação  
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre  
2019

“ O universo trabalha em seu favor e colocou em seu espírito tudo o que você precisa para ser vencedor em todas as áreas de sua vida”

Zibia Gaspareto

## **Agradecimentos**

Ao final desta jornada agradeço a todos aqueles que me ajudaram, incentivaram, de perto ou longe, em pensamento ou momento presente, muitas vezes apenas mentalizando um pensamento positivo de sucesso; aqueles que vibraram comigo ao longo dessa jornada, muito obrigada!

Ao meu orientador Professor Marino Muxfeldt Bianchin, pelo apoio, pelas inúmeras orientações, por ter me aceitado como sua orientanda e acima de tudo nunca ter deixado eu desistir.

Agradecimento especial aos meus pais, Leila e Renan, que nunca mediram esforços para me dar a melhor educação possível e sempre me incentivaram a seguir em frente na minha trajetória profissional; aos meus irmãos pelo carinho, apoio e experiências compartilhadas.

Agradecimento com todo o amor do mundo ao meu marido, Bruno, pela paciência, pela ajuda, compreensão nos momentos difíceis, pelo incentivo na hora que o desânimo batia, e as minhas filhas que são minha razão de viver e seguir em frente.

Aos meus amigos, compadres, sempre dispostos a ajudar, e à minha família, que se não fossem os momentos de descontração que juntos passamos, essa jornada teria sido bem mais árdua.

Agradecimento aos meus colegas de trabalho pois sem a ajuda, o apoio e a compreensão deles eu não teria chegado ao fim.

Ao serviço de Patologia do Hospital de Clínicas pela disponibilidade de acesso aos materiais, aos professores e contratados que contribuíram com seu conhecimento e experiência, pela amizade ao longo desses anos e aos funcionários.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela estrutura e empenho de proporcionar aos alunos uma oportunidade de qualificação em uma universidade respeitada.

Muito Obrigada!

## RESUMO

**Introdução:** O adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é uma doença altamente agressiva usualmente diagnosticada em estágio avançado e para a qual poucas terapias efetivas estão disponíveis. É uma neoplasia cuja incidência é quase igual à mortalidade. A razão pela qual o câncer de pâncreas apresenta prognóstico tão reservado e o porquê da baixa resposta terapêutica ao tratamento quimio e radioterápico ainda são questões que têm motivado a busca de uma resposta que possa, de alguma maneira, modificar o curso desta neoplasia. Entre processos mais recentemente envolvidos na carcinogênese e progressão tumoral, as alterações em células tronco tumorais (CSCs, do inglês *cancer stem cells*) são processos ainda pouco estudados no câncer de pâncreas, sem resultados satisfatórios, merecendo, portanto, maiores esforços na elucidação do seu comportamento e relação com a aquisição do fenótipo maligno pancreático. Recentes evidências têm sugerido que as CSCs desempenham um papel crucial não só na geração e manutenção de diferentes tecidos, mas também no desenvolvimento, progressão e resistência terapêutica de diferentes tipos tumorais. **Objetivos:** Estudar o perfil de expressão de marcadores de CSCs no adenocarcinoma ductal pancreático por técnica de imunohistoquímica. Isso será realizado por meio da análise do perfil de marcação de células pancreáticas tumorais pelos anticorpos CD24, CD133 e Oct4 utilizando a técnica de *tissue microarray* em peças provenientes de ressecção pancreática e biópsias e posterior correlação dos achados com dados clínicos, resposta terapêutica, sobrevida global e livre de doença dos pacientes incluídos no estudo, a fim de determinar o papel prognóstico dos marcadores anteriormente descritos. **Materiais e métodos:** Uma análise clinicopatológica, retrospectiva, foi realizada em 112 pacientes diagnosticados com câncer de pâncreas entre os anos de 2005 e 2010, e realizado estudo imunohistoquímico com os anticorpos CD133, CD24 e Oct4 pela técnica de Tissue Microarray para a detecção de células com fenótipos de células tronco tumorais, com posterior correlação dos resultados com dados clínicos, de progressão tumoral, resposta terapêutica e sobrevida. As amostras do estudo compreendem casos de Adenocarcinoma ductal pancreático, os quais foram selecionados a partir da rotina assistencial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, junto ao Serviço de Patologia. Marcação nuclear ou citoplasmática positiva para cada anticorpo foi medida quanto à intensidade, sendo classificadas dicotomicamente em grupos de baixa/moderada intensidade ou forte. Os resultados foram analisados em relação aos parâmetros clinicopatológicos de cada paciente. **Resultados:** Os três marcadores de células tronco tumorais (CTTs) testados exibiram positividade nas células neoplásicas do câncer de pâncreas, corroborando com a hipótese da existência de CTTs no desenvolvimento e manutenção do fenótipo agressivo pancreático. Observou-se associação significativa entre a presença de alguns marcadores de células tronco-tumorais com variáveis de pior prognóstico, como a presença de metástase ( $p = 0,037$ ), e tipo de tratamento realizado (apenas possibilidade de tratamento paliativo;  $p = 0,019$ ). O grau de diferenciação tumoral mostrou relação, embora não significativa, com a positividade dos anticorpos, onde o CD133 e CD24 mostraram uma prevalência alta em tumores pouco diferenciados, mais agressivos, enquanto que as células que expressaram o anti-corpo OCT4 exibiram maior potencial de diferenciação. A marcação positiva ao longo do estágio TNM mostrou-se uniforme, não se amplia conforme o estágio progride, estando presente desde os estágios iniciais do tumor. Sobrevida global e livre de doença não mostrou relação com a expressão dos anti-corpos. **Conclusão:** A expressão de células tronco-tumorais em amostras de Adenocarcinoma ductal pancreático indica a presença dessas células no processo de carcinogênese e desenvolvimento tumoral, com manutenção do fenótipo maligno pancreático e resistência terapêutica.

**Palavras-chave:** Células tronco tumorais. Câncer de pâncreas. Resistência terapêutica. Câncer e células tronco. CD133. CD24. OCT4.

## ABSTRACT

**Introduction:** Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a highly aggressive disease usually diagnosed in an advanced stage and for which few effective therapies are available. It is a neoplasm whose incidence is almost equal to its mortality. The poor prognosis of pancreatic cancer and the low therapeutic response to chemotherapy and radiotherapy have motivated the search for an answer that can modify the course of this disease. Among the processes most recently implicated in carcinogenesis and tumor progression, changes in cancer stem cells (CSCs) are still poorly studied in pancreatic cancer with no satisfactory results, and are deserving of greater efforts in elucidating their effects and relationship with the acquisition of a pancreatic malignant phenotype. Recent evidence has suggested that CSCs play a crucial role not only in the generation and maintenance of different tissues, but also in the development, progression, and therapeutic resistance of different tumor types. **Objectives:** To study the expression profile of CSC markers in pancreatic ductal adenocarcinoma by immunohistochemistry. This will be accomplished by analyzing the tumor pancreatic cell labeling profile by CD24, CD133, and OCT4 staining using tissue microarray techniques on samples from pancreatic resection and biopsies and further correlating findings with clinical data, therapeutic responses, overall survival, and disease-free survival of the patients included in the study to determine the prognostic role of the previously described markers. **Materials and methods:** A retrospective clinicopathological analysis was performed on 112 patients diagnosed with pancreatic cancer between 2005 and 2010, and a CD133, CD24, and OCT4 immunohistochemical study was performed using the tissue microarray technique to detect cells with stem cell phenotypes. These results were correlated with clinical data, tumor progression, therapeutic response, and survival. The study samples included cases of PDAC, which were selected from the routine care of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre from their Pathology Service. Positive nuclear or cytoplasmic labeling for each antibody was measured for intensity, and dichotomously classified into low/moderate or strong intensity groups. The results were analyzed relative to the clinicopathological parameters of each patient. **Results:** The three cancer stem cell markers (CSCsTTs) tested exhibited positivity in pancreatic cancer neoplastic cells, corroborating the hypothesis of the existence of CSCs in the development and maintenance of the pancreatic aggressive phenotype. Significant association was observed between the presence of some stem-tumor cell markers with worse prognostic variables, such as the presence of metastasis ( $p = 0.037$ ), and type of treatment performed (only palliative treatment possibility;  $p = 0.019$ ). The degree of tumor differentiation was related, although not significant, to antibody positivity, where CD133 and CD24 showed a high prevalence in more aggressive, poorly differentiated tumors, while cells expressing the OCT4 antibody showed a higher potential for differentiation. Positive labeling throughout the TNM stage was uniform, did not broaden as the stage progressed, and was present from the very early stages of the tumor. Overall, disease-free survival was not related to antibody expression. **Conclusion:** The expression of stem-tumor cells in pancreatic ductal adenocarcinoma samples indicates the presence of these cells in the process of carcinogenesis and tumor development, with maintenance of the pancreatic malignant phenotype and therapeutic resistance.

**Keywords:** Tumor stem cells, pancreatic cancer, therapeutic resistance, cancer and stem cells, CD133, CD24, OCT4

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cancer stem cells and tumor progression.....	15
Figura 2 – Eventos celulares da carcinogênese.....	16
Figura 3 – Etapas da carcinogênese.....	17
Figura 4 – Formação do tumor maligno.....	18
Figura 5 – Fatores de risco para câncer de pâncreas.....	23
Figura 6 – Modelo de progressão do adenocarcinoma pancreático.....	27
Figura 7 – Interações entre células troco tumorais (CTT's).....	36



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BRCA	Breast cancer (câncer de mama)
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A</i>
CSC'S	<i>Cancer Stem Cells</i>
CTT's	Células tronco tumorais
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
EBV	Vírus Epstein-Barr
HBV	Vírus da hepatite B
HPV	Papiloma vírus humano
HTLV	Vírus linfotrófico da célula T humana
INCa	Instituto Nacional de Câncer
KRAS	Gene KRAS
N-MYC	Proteína proto-oncogene
NIPan	Neoplasia intra-epitelial pancreática
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
RNA	Ácido ribonucleico
TMA	<i>Tissue microarray</i>
UICC	União Internacional Contra o Câncer
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
<b>2.1 Estratégias de busca</b> .....	13
<b>2.2 O processo de carcinogênese</b> .....	13
<b>2.3 O câncer de pâncreas</b> .....	20
2.3.1 Os fatores de risco.....	21
2.3.2 Epidemiologia.....	24
2.3.3 Modelo de progressão do Adenocarcinoma Ductal Pancreático e Alterações Moleculares.....	25
2.3.4 Mecanismos genético-moleculares.....	29
<b>2.4 Células tronco no desenvolvimento tumoral</b> .....	31
2.4.1 Papel das células tronco tumorais no comportamento do câncer de pâncreas.....	37
2.4.2 Marcadores para identificação de células tronco tumorais na prática clínica.....	38
2.4.3 Análise imunohistoquímica por <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	41
<b>3. MARCO CONCEITUAL</b> .....	43
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	44
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	45
<b>5.1 Objetivo primário</b> .....	45
<b>5.1 Objetivos secundários</b> .....	45
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46
<b>7. ARTIGO</b> .....	60
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	86
<b>10. ANEXOS E/OU APÊNDICES</b> .....	87
<b>11. STROBE</b> .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar do progresso no diagnóstico e tratamento do câncer nas últimas décadas, este ainda continua sendo uma das causas mais comuns de morte em todo o mundo. Potencialmente curável quando diagnosticado precocemente, continua ainda sendo um desafio na prática clínica diária, o diagnóstico precoce. Muitos cânceres são diagnosticados em um estágio tardio, em que as opções terapêuticas já não são mais eficazes.

O reconhecimento dos mecanismos genético-moleculares implicados na gênese e na progressão do câncer, nas últimas décadas, tem possibilitado o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e terapêuticos e de tecnologias para o acompanhamento em diversos tipos de neoplasias<sup>(1-2)</sup>. O estudo das características moleculares de cada tumor permitirá uma melhor compreensão do seu comportamento e, então, ajudará a delinear estratégias terapêuticas mais efetivas e formas inovadoras de rastreamento, adicionais as opções já existentes<sup>(3)</sup>. Já está bem elucidado pela literatura atual que o desenvolvimento de uma neoplasia envolve um conjunto de alterações moleculares que levam não só ao surgimento e sobrevivência de uma célula tumoral, bem como ao poder de invasão de tecidos adjacentes e metástases à distância. Tais alterações incluem mudanças em oncogenes e genes supressores tumorais, alterações do ciclo celular e apoptose<sup>(4)</sup>.

O Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), doença altamente agressiva usualmente diagnosticada em estágio avançado, considerada uma das neoplasias mais letais no mundo, é uma neoplasia que se beneficiará em muito das novas técnicas terapêuticas e diagnósticas com o incremento da biologia molecular, pois, embora não seja uma das neoplasias mais comuns, é o nono tipo de câncer mais frequente no mundo e a sétima causa de morte relacionada ao câncer no mundo<sup>(5)</sup> e a taxa de incidência praticamente equivale-se à taxa de mortalidade<sup>(6)</sup>. Apesar dos avanços na técnica cirúrgica, hoje, considerada a única opção de cura, a taxa de sobrevivência média em cinco anos gira em torno de menos de 5% (1% a 3%)<sup>(5,7-8)</sup>. É considerada a neoplasia com pior prognóstico dentre mais de 60 tipos de câncer, fato evidenciado pela taxa de incidência praticamente igualar-se à taxa de mortalidade<sup>\*(9)</sup>.

---

\*Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C. Pancreatic carcinoma. N Engl J Med. 1992; 326: 455-65.

A habilidade de detectar sucessivas alterações genéticas e moleculares dentro de um paradigma de que existe uma lesão pré-cancerígena e, potencialmente detectável, ou ainda melhor, entender o comportamento biológico desses tumores, fornecem um mecanismo útil para a detecção de alterações precoces e definição de marcadores prognósticos<sup>(10-11)</sup>. Diante disso, tem-se feito necessária a busca por esforços para identificar biomarcadores que poderiam potencialmente identificar a neoplasia em estágios precoces e até prever o seu comportamento. Frente a uma neoplasia tão agressiva e silenciosa como o Adenocarcinoma de pâncreas, em que a mortalidade praticamente iguala-se a sua incidência e que a detecção clínica torna-se um desafio, é que os recentes avanços na compreensão da biologia molecular da carcinogênese, adicionais as práticas já existentes, contribuirão representando, pois, uma promissora ferramenta para o aperfeiçoamento de técnicas de rastreio, para abordagem terapêutica e desenvolvimento de drogas alvo-moleculares<sup>(8)</sup>.

Entre processos mais recentemente envolvidos na carcinogênese e progressão tumoral estão as alterações a nível de células tronco tumorais (CSCs, do inglês *cancer stem cells*), que contribuem para o desenvolvimento e progressão tumoral, porém ainda são processos pouco estudados no câncer de pâncreas, merecendo, portanto, maiores esforços na busca do entendimento do seu comportamento e relação com a aquisição do fenótipo maligno pancreático<sup>(12)</sup>. Cabe salientar que a detecção precoce, em um estágio que ainda exista a opção de cura, associada à maior efetividade terapêutica é, no momento, uma das alternativas para melhorar a perspectiva sombria dos pacientes diagnosticados com câncer de pâncreas<sup>(13)</sup>.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Estratégia de Busca**

A presente revisão da literatura foi embasada em artigos que estudaram e analisaram a correlação entre a presença de Células tronco tumorais e diversos tipos de câncer, com o intuito de realizar uma revisão bibliográfica ampla que fornecesse dados suficientes para embasar a presente pesquisa. Ao final pretende-se estabelecer uma relação entre a expressão de marcadores de células tronco tumorais e as células malignas do tumor, e comparar com a relação que essas células já apresentam com outros tumores como mama e cólon, por exemplo, e com o desfecho clínico dos pacientes, e se possível usufruir dessas informações na prática clínica, porém não se sabe ainda se em termos de diagnóstico, prognóstico e/ou terapêutico. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO e PubMed. No entanto a maioria dos artigos foram encontrados no PubMed. Alguns artigos foram usados para embasar o texto e outros usados apenas para leitura complementar. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCa) também foram usados. Foram realizadas buscas através dos termos “Pancreatic ductal adenocarcinoma” “Cancer stem cells and pancreatic cancer”, “CD133, CD24 and OCT4 and cancer” e suas combinações. Foram utilizados cerca de 81 artigos para a revisão da literatura e mais a leitura complementar.

### **2.2 O processo de carcinogênese**

A carcinogênese envolve uma série de eventos sequenciais, frequentemente deflagrados quando as células perdem o controle do crescimento devido ao acúmulo de mutações em seu DNA, levando à proliferação celular descontrolada. A maioria dos tumores malignos, câncer, seguem uma história natural que pode ser dividida em quatro fases: transformação maligna, crescimento da célula tumoral, invasão local e metástase. O processo de carcinogênese, ou transformação maligna, ocorre em vários estágios e resulta do acúmulo de alterações genéticas, as mutações, que são desencadeadas por diversos fatores, entre eles ambientais, como radiação, substâncias químicas, ou por uma desregulação intrínseca da célula<sup>(14-15)</sup>. O

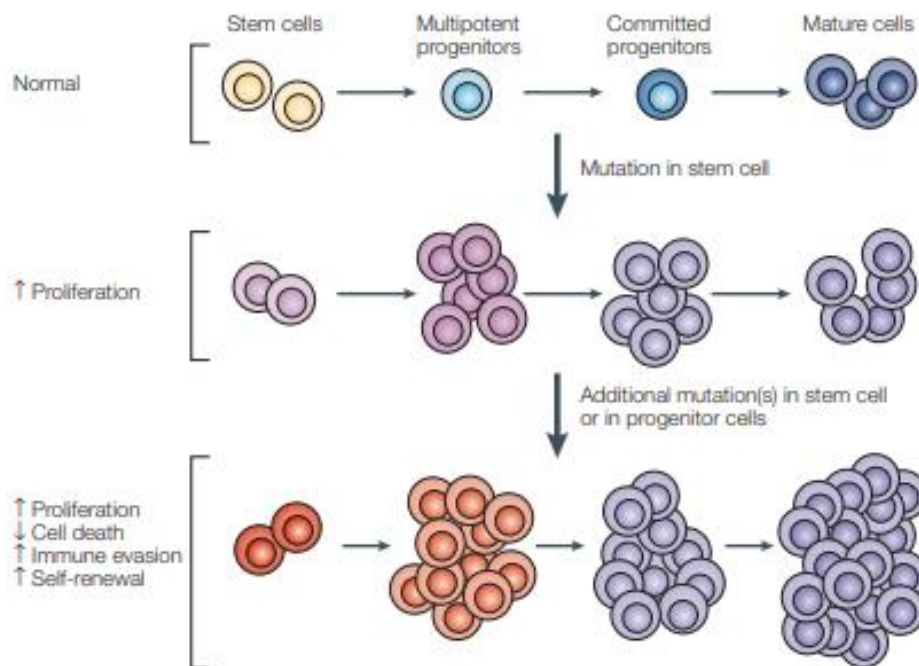
acúmulo de mutações leva ao surgimento de um clone de células com fenótipo bem mais agressivo e com características intrínsecas como a quimioresistência. As células cancerígenas tem o poder de influenciar o microambiente em que estão tornando-o permissivo ao crescimento tumoral e a sobrevivência de um fenótipo maligno resistente e agressivo. Isso explica porque muitas vezes o resultado do tratamento é relativamente ruim e mais difícil de manejar quando o paciente se encontra em um estágio avançado<sup>(16)</sup>.

As células no organismo vivem em harmonia e equilíbrio, visando o controle do crescimento celular. Alguns fatores extrínsecos ou intrínsecos das células servem de estímulo quando há exigências especiais como, por exemplo, para reparo de uma alteração tissular, onde as células se multiplicam até que o tecido se regenere. Mas existem mecanismos que são reguladores deste crescimento celular, e, em algumas ocasiões, ocorre uma ruptura dos mecanismos reguladores da multiplicação celular e, sem que seja necessário ao tecido, uma célula começa a crescer e multiplicar-se, porém de maneira desordenada, resultando em uma célula anômala, que segue multiplicando-se resultando na formação do que se chama tumor ou neoplasia, que pode ser benigna ou maligna. A carcinogênese refere-se ao desenvolvimento de tumores malignos, estudada com base nos fatores e mecanismos a ela relacionados, e os principais genes envolvidos são chamados de proto-oncogenes, que são genes que estimulam essas células a se multiplicarem e formarem a neoplasia, e os genes supressores tumorais, que servem de “freio” a esse estímulo desordenado<sup>(16)</sup>.

Essas duas classes então de genes reguladores do crescimento tumoral encontram-se presentes nas células normais: os proto-oncogenes, que promovem o crescimento e os genes supressores de tumor, que inibem o crescimento celular. Desequilíbrio, mutações, promovem alterações nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor levando ao desenvolvimento de células com crescimento descontrolado (Figura 1). Existe uma variedade de vias sinalizatórias nas quais os oncogenes podem ser ativados de forma anormal para induzir o crescimento tumoral<sup>(17)</sup>. A faixa genômica na qual os genes estão contidos pode ser amplificada, levando ao aumento significativo da quantidade de cópias. Um exemplo clássico é o oncogene N-MYC, que pode ser amplificado em até 100 vezes em neuroblastomas humanos. Os oncogenes podem sofrer mutações que resultam na ativação

constitutiva do gene. Nessas situações, o gene está sempre “ligado”, passando a ser não-responsivo aos sinais inibitórios dos supressores tumorais<sup>(18)</sup>.

**Figura 1 - Cancer stem cells and tumor progression**

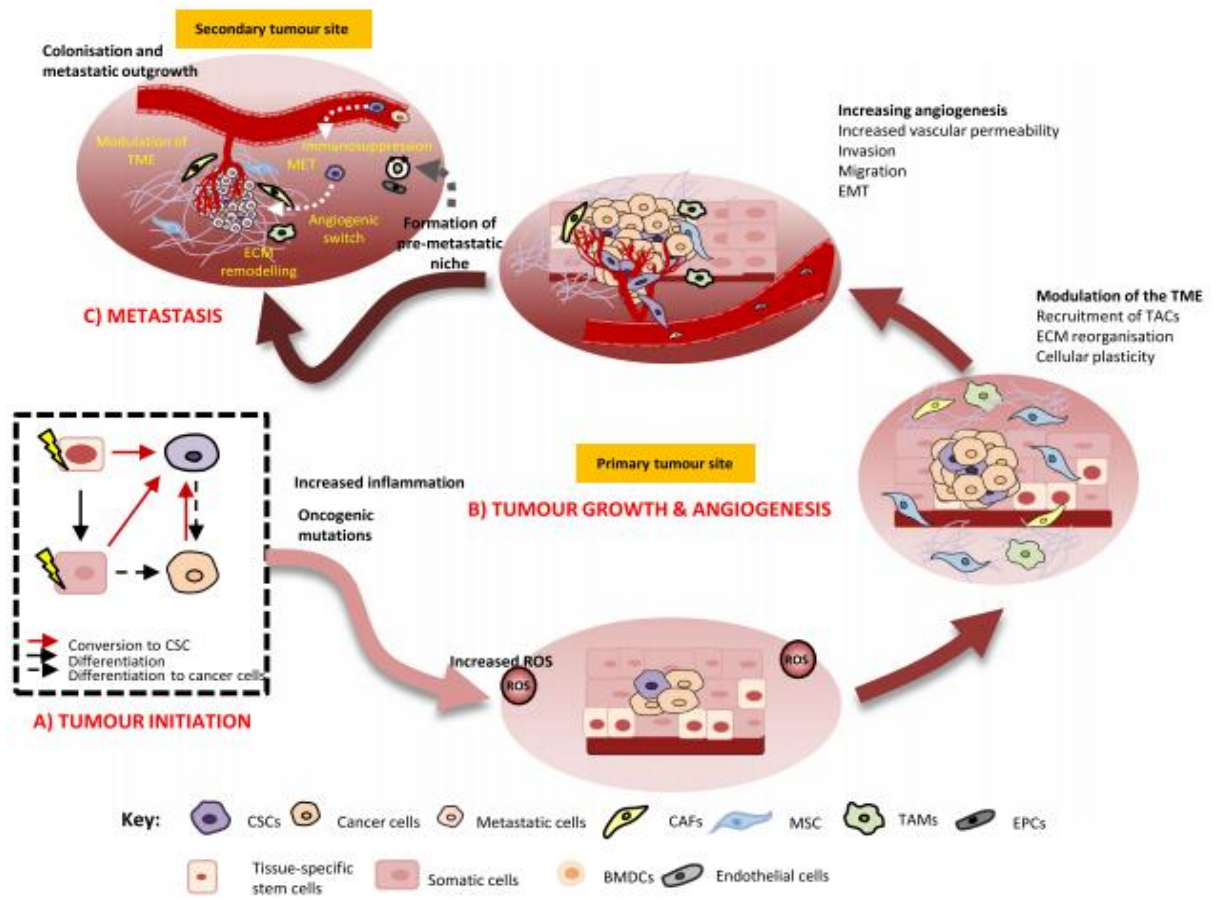


**Fonte:** Dean, Fojo e Beates, 2005. (bibliografia complementar)

Sabe-se hoje ainda que os oncogenes que levam à formação do tumor estão também relacionados a genes normais, o que põe em questão o verdadeiro papel destes genes no crescimento e desenvolvimento das células normais e tumorais. Já está bem estabelecido que as etapas da iniciação e promoção de um tumor até o desenvolvimento de uma neoplasia maligna dependem da expressão aumentada de oncogenes, ocasionada por amplificação, que é o aumento do número de cópias do gene e consequente aumento do efeito, por expressão alterada de genes repressores ou por mutações em determinado oncogene<sup>(4)</sup>.

Já está descrito que a progressão tumoral envolve processos celulares e moleculares complexos que são precedidos pelas alterações genéticas e epigenéticas, levando a transformação das células cancerosas. Conceitualmente, o processo de carcinogênese pode ser dividido em três estágios dinâmicos celulares que são: iniciação, promoção e progressão, esquematizados nas figura 2 e 3:

**Figura 2 - Eventos celulares da carcinogênese**



Fonte: Ayob e Ramasamy, 2018.



**Figura 3 - Etapas da carcinogênese**



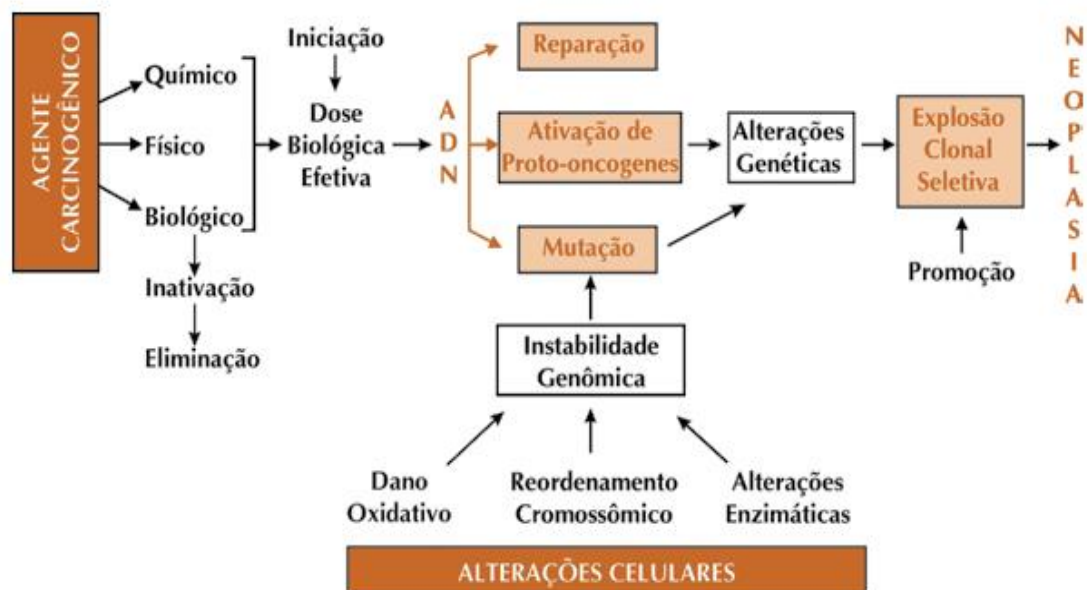
**Fonte:** adaptado de Oliveira, 2002. (bibliografia complementar)

Muitos são os fatores carcinogênicos a que as células do organismo estão expostas, e que perturbam o equilíbrio entre os genes supressores e proto-oncogenes. Sabe-se que a predisposição individual tem um papel importante na resposta final, porém não é possível definir em que grau ela influencia a relação entre a dose e o tempo de exposição ao carcinógeno e a resposta individual à exposição. Porém, muitas vezes independentemente da exposição a carcinógenos, as células sofrem processos de mutação espontânea. Os fenômenos de mutação espontânea podem condicionar uma maior ou menor instabilidade genômica, que pode ser crucial nos processos iniciais da carcinogênese, que pode então dar-se por um processo espontâneo ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). O sistema imunológico do hospedeiro, no caso o indivíduo afetado, pode ter o poder de exclusão ou correção das células mutantes, mecanismo desencadeado de acordo com a resposta imunológica do organismo<sup>(19)</sup>.

Os fatores carcinogênicos podem ser físicos, químicos ou biológicos (Figura 3). As diferenças entre prevalência e incidência de certos tipos de tumores, distribuição geográfica e comportamento estão relacionados a múltiplos fatores, incluindo raça, sexo, idade, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais. Os carcinógenos químicos, como os presentes no tabaco, resultantes de

sua combustão e metabolismo, assim como outros agentes como os benzeno, xileno, tolueno, foram claramente implicados na indução de câncer no homem e animais<sup>(20)</sup>. Certos vírus de DNA do grupo Papiloma vírus humano (HPV), de Epstein-Barr (EBV) e o da hepatite B (HBV), também foram implicados como agentes carcinogênicos em alguns tipos de câncer. Os vírus de RNA (retrovírus) se relacionam mais raramente com o câncer humano. O único comprovadamente oncogênico é o retrovírus HTLV 1, responsável pela leucemia/linfoma da célula T do adulto e pelo linfoma cutâneo de célula T. A energia radiante, solar e ionizante, é o mais importante carcinógeno físico, por sua capacidade de induzir mutação. A radiação ultravioleta natural, proveniente do sol, por exemplo, é responsável pelo desenvolvimento de tumores cutâneos<sup>(21)</sup>.

**Figura 4 – Processo de carcinogênese**



**Fonte:** INCA, 2002. (bibliografia complementar)

A oncogênese química é um processo sequencial que se divide em três fases: a iniciação, promoção e progressão. A primeira etapa, denominada de iniciação, consiste, como o próprio nome induz, de um fator iniciador ou carcinogênico que causa dano ou mutação celular, dos ácidos nucleicos. As células “iniciadas” permanecem latentes até que sofram a ação de agentes promotores, caracterizando a segunda etapa. Esta é chamada de promoção, e estimula o crescimento da célula

que sofreu a iniciação/mutação, e pode acontecer a qualquer momento, após a transformação celular inicial. As células geneticamente alteradas, "iniciadas", sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor, o que significa que seus efeitos revertem-se caso a exposição a ele seja cessada, alvo de muitas ações preventivas do câncer<sup>(16)</sup>. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas. Os fatores de promoção podem ser agentes químicos (p. ex. benzeno, sílica, amianto), processo inflamatório, hormônios. Nos processos de iniciação e promoção, a célula ainda pode encontrar-se sob a ação dos fatores de inibição do crescimento, e o resultado final dependerá do balanço obtido entre estes fatores e a intensidade das alterações provocadas nas células pela ação dos agentes iniciadores e promotores<sup>(16,19)</sup>.

O último e não menos essencial é o estágio da progressão, que se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio, o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença, porém aqui cabe salientar que esse tempo entre a instalação da doença e manifestação clínica pode ser muito variável dependendo do tecido afetado. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos. O fumo, por exemplo, é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese<sup>(16,22)</sup>.

## 2.3 O câncer de pâncreas

O adenocarcinoma ductal pancreático é um tumor agressivo que apresenta uma alta letalidade e para o qual poucas opções terapêuticas estão disponíveis, representando a sétima causa de morte relacionada ao câncer no mundo todo<sup>(4-5)</sup>. No Brasil, representa 2% de todos tipos de câncer e 4% do total de mortes por câncer. Apenas 10% dos pacientes descobrem a lesão em estágio inicial, quando a ressecção cirúrgica ainda pode ser uma opção. Mais de 90% dos pacientes já descobre a lesão em estágio avançado<sup>(5)</sup>. A maioria dos pacientes apresenta invasão local ou metástase à distância no momento do diagnóstico, sendo apenas 15% destes candidatos à ressecção cirúrgica. Mesmo após a ressecção completa, sem margens positivas, a taxa de sobrevida em cinco anos não excede 20%<sup>(4,12)</sup>. Devido ao tratamento tardio e prognóstico ruim, a taxa de sobrevida durante o primeiro ano do diagnóstico é muito baixa (10%-20%), e diminui para 5% nos próximos 5 anos. Isto pode ser parcialmente explicado pela complexidade molecular e pela população celular mista presente nos adenocarcinomas ductais pancreáticos, o que também pode explicar o curso clínico heterogêneo observado na prática diária<sup>(23)</sup>. O prognóstico está diretamente relacionado ao estadiamento da doença no momento do diagnóstico. A sobrevida em 5 anos é de 24,1% para doença localizada, 9% para casos com comprometimento regional e 2% para doença avançada, já com metástases à distância<sup>(12)</sup>.

Segundo Barbosa, Santos e Souza<sup>(5)</sup>, entre os anos de 2000 e 2014 houveram 112.533 mortes devido ao câncer de pâncreas no Brasil, sendo que destas mortes 50.2% ocorreram em homens e 49.8% em mulheres. A sobrevida a longo prazo permanece baixa, apesar dos avanços das últimas décadas em termos de diagnóstico e tratamento. A sobrevida em um ano aumentou, entre os anos de 1981 e 2010, de 17% para 19%, e a sobrevida em cinco anos de 3.1% para 4.4%<sup>(5)</sup>.

É considerada a neoplasia com pior prognóstico dentre mais de 60 tipos de câncer, fato evidenciado pela taxa de incidência praticamente igual à sua taxa de mortalidade<sup>(9)</sup>. Por conta do limitado arsenal diagnóstico e terapêutico atualmente disponível, somado a um comportamento intrínseco agressivo, é uma neoplasia que se beneficiará em muito de novas técnicas diagnósticas e terapêuticas advindas de estudos inovadores em biologia molecular<sup>(24)</sup>.

Os fatores de risco hoje comprovados, ambientais e genéticos, são história familiar positiva, idade e fumantes de longa data. Segundo a União Internacional contra o Câncer (UICC), a incidência por idade gira em torno de 10/100.000 entre 40-50 anos e 116/100.000 entre 80-85 anos, com pico de incidência entre 60-80 anos. Menos de 10% dos casos ocorre em indivíduos abaixo de 55 anos, e a incidência é maior em homens do que em mulheres<sup>(5)</sup>. Outros fatores supostamente envolvidos são consumo de álcool, dieta rica em gordura, obesidade, diabetes mellitus de longa data e pancreatite crônica. Cerca de 10% dos pacientes tem predisposição familiar, o que assegura o papel de alguns genes envolvidos no processo, tais como mutação nos genes CDKN2, BRCA2, PALB2, STK11 e PRSS1, que tem demonstrado aumento do risco de desenvolvimento do câncer<sup>(4-5,11)</sup>.

A razão pela qual o câncer de pâncreas apresenta prognóstico tão reservado e o porquê da baixa resposta terapêutica ao tratamento quimio e radioterápico ainda são questões que têm motivado a busca de uma resposta que possa, de alguma maneira, modificar o curso desta neoplasia. Soma-se ainda o fato de o diagnóstico ser tardio, pois a doença é geralmente diagnosticada em um estágio avançado, quando a intervenção cirúrgica não é mais possível. A detecção do tumor em um estágio inicial e, portanto, potencialmente ressecável, pode aumentar a taxa de sobrevivência em cinco anos acima de 40%<sup>(7)</sup>.

A biologia molecular do câncer de pâncreas está diretamente relacionada à sua rápida progressão e à baixa resposta terapêutica. Já está bem documentado que o surgimento de uma célula tumoral é resultante de um acúmulo de mutações em seu DNA capazes de alterá-la morfológica e funcionalmente<sup>(18,25)</sup>. O gatilho desse processo e toda sua evolução, culminando com a formação da célula tumoral e as características a ela pertinentes, caracterizam o processo de carcinogênese, que já está mais elucidado para algumas neoplasias, como o câncer colorretal, e para outras, como o câncer de pâncreas, no entanto, ainda permanece incerto.

### 2.3.1 Os fatores de risco

O Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é responsável por mais de 90% das neoplasias do pâncreas<sup>(26)</sup>. As causas do adenocarcinoma do pâncreas permanecem incertas. Os fatores de risco, demográficos e ambientais, relacionados a esta neoplasia incluem o tabagismo, história familiar, pancreatite crônica de repetição, idade avançada, sexo masculino, diabetes *melitus*, obesidade (dietas ricas em carne vermelha e pobre em vegetais e folato), grupo sanguíneo não-O, exposição ocupacional a solventes, níquel, etnia afro-americana, infecção pelo *H. pylori* e mutação no gene da fibrose cística<sup>(11,13)</sup>. A idade avançada é o fator de risco demográfico mais relevante, que merece ser destacado, pois cerca de 80% dos carcinomas pancreáticos ocorrem entre as idades de 60 e 80 anos. O tabagismo é o mais significativo fator ambiental. Estudos de caso-controle relatam aumento de até 5 vezes na chance de apresentar adenocarcinoma em pacientes fumantes versus não-fumantes, com associação de até 30%; o risco aumenta em fumantes pesados e também em fumantes passivos com exposição ao tabaco de longa data; e ainda são limitados quanto à associação da ingestão de álcool e cafeína<sup>(2,13,26)</sup>.

Os estudos ainda são um pouco controversos no que diz respeito à pancreatite crônica. Os valores de associação variam de risco aumentado em 4 vezes maior a 14 vezes maior; um último estudo francês apoia os resultados que defendem uma associação maior, visto que encontraram uma associação de 19 vezes maior nestes pacientes. Há um aumento da incidência proporcional ao tempo de evolução da doença, a cada década há aumento do risco de aproximadamente 2%. A incidência é de 1,8% aos 10 anos após o diagnóstico de pancreatite e 4,0% após 20 anos<sup>(2,13)</sup>.

O fator de risco considerado mais importante para o desenvolvimento do Adenocarcinoma pancreático é a predisposição genética. Aproximadamente 10% dos pacientes com ADP têm ou terão um parente de primeiro ou segundo grau acometido, e 5-10% dos pacientes com câncer tem história familiar pregressa positiva<sup>(27)</sup>. Os fatores genéticos, como o tipo de herança envolvida e os genes responsáveis ainda não estão bem estabelecidos, mas acredita-se que tenha forte associação com mutações no gene BRCA2 e KRAS. Indivíduos com síndromes hereditárias conhecidas, dentre elas a pancreatite hereditária, câncer de mama

hereditário (BRCA1, BRCA2), melanoma múltiplo atípico familiar, síndrome da mutação do p16 e a síndrome de Peutz-Jeghers, tem risco aumentado de desenvolver câncer de pâncreas<sup>(13)</sup>.

Segundo Ardengh, Coelho e Osvaldt<sup>(13)</sup>, os fatores de risco, uma vez identificados, devem ser categorizados em três escalas conforme o risco de associação com adenocarcinoma de pâncreas: baixo, moderado e alto risco. A figura a seguir exhibe essa categorização com seus respectivos níveis de associação.

**Figura 5 - Fatores de risco para câncer de pâncreas**

<b>Risco baixo (aumentado de 1-5 vezes)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sexo masculino</li> <li>- <b>Negros</b></li> <li>- Judeus de ascendência asquenaze</li> <li>- <b>Obesos</b></li> <li>- <b>Fumantes</b></li> <li>- <b>Diabéticos</b> <input type="text" value="Captura Retangular"/></li> <li>- <b>Indivíduos com infecção por <i>Helicobacter pylori</i></b></li> <li>- <b>Indivíduos com história de qualquer tipo de câncer em um parente de primeiro grau</b></li> <li>- <b>Indivíduos com câncer colorretal (não polipose)</b></li> <li>- <b>Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em um parente de primeiro grau</b></li> <li>- <b>Indivíduos com mutação genética BRCA1</b></li> </ul>
<b>Risco moderado (aumentado 5-10 vezes)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em dois parentes de primeiro grau</b></li> <li>- <b>Indivíduos com fibrose cística</b></li> <li>- <b>Indivíduos com pancreatite crônica</b></li> <li>- <b>Indivíduos com mutação genética BRCA2</b></li> </ul>
<b>Risco alto (aumentado mais de 10 vezes)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Indivíduos em grupos familiares com melanoma atípico familiar (FAMMM) com mutação p16 e pelo menos um caso de câncer de pâncreas em parente de primeiro grau ou segundo grau</b></li> <li>- <b>Indivíduos com síndrome de Peutz-Jeghers</b></li> <li>- <b>Indivíduos com pancreatite hereditária</b></li> <li>- <b>Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em três ou mais parentes de primeiro, segundo ou terceiro grau</b></li> <li>- <b>Possivelmente: indivíduos com mutações BRCA1 e BRCA2, com pelo menos um parente de primeiro e segundo grau com câncer de pâncreas</b></li> </ul>

**Fonte:** Ardengh, Coelho e Osvaldt, 2008, p. 171.

### 2.3.2 Epidemiologia

O câncer de pâncreas representa hoje um grave problema de saúde pública. Em 2011, o país teve 7.726 mortes, sendo 3.803 em homens e 3.923 em mulheres<sup>(28)</sup>. No ano de 2012 tivemos 337.000 casos de câncer de pâncreas no mundo, sendo que destes, 330.000 morreram devido à doença<sup>(5)</sup>.

Dados do Instituto Nacional do Câncer<sup>(28)</sup> estimam que, no Brasil, o câncer de pâncreas representa 2% de todos os tipos de câncer e é responsável por 4% do total de mortes por câncer. Segundo Moraes<sup>(29)</sup>, houve um comportamento ascendente das taxas de mortalidade padronizadas por idade para câncer de pâncreas no Brasil (2,56/100.000 em 1980-1982 e 3,2/100.000 em 1995-1997), o que corresponde a um incremento médio anual de 1,31% no período analisado. Segundo Barbosa, Santos e Souza<sup>(5)</sup>, entre os anos de 2000 e 2014 houveram 112.533 mortes devido ao câncer de pâncreas no Brasil, sendo que destas mortes 50.2% ocorreram em homens e 49.8% em mulheres. A sobrevida a longo prazo permanece baixa, apesar dos avanços das últimas décadas em termos de diagnóstico e tratamento. A sobrevida em um ano aumentou, entre os anos de 1981 e 2010, de 17% para 19%, e a sobrevida em cinco anos de 3.1% para 4.4%<sup>(5)</sup>.

No Rio Grande do Sul (RS), que corresponde ao Estado com a maior média, Porto Alegre teve a maior taxa, com 9,4 e 5,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente. A média do estado foi de 7,05/100.000, seguido pela região sudeste, no estado do Rio de Janeiro, com 4,13/100.000.

As variações nas taxas de incidência e mortalidade do câncer de pâncreas ao redor do mundo podem ser indicadores de diferenças na prevalência dos fatores de risco envolvidos, entre sexo e raças, evidenciando as diferenças entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos e a exposição das pessoas aos fatores de risco, como álcool, tabaco, além do acesso aos serviços de saúde, desigual na maioria dos países, refletindo ainda a capacidade de diagnóstico de cada região.

As estimativas ou projeções de mortalidade para o Brasil são que, entre os anos de 2025-2029, o câncer de pâncreas será responsável por 38.551 mortes em mulheres e 41.952 em homens, segundo Barbosa, Santos e Souza<sup>(5)</sup>, podendo ser a principal causa de morte relacionada ao câncer gastrointestinal. No Canadá, as estimativas indicam que o número da taxa de mortalidade pode dobrar, em virtude



do aumento da população acima de 65 anos, e nos EUA os dados mostram que em 2030 o câncer de pâncreas será uma das três principais causas de morte relacionadas ao câncer, com uma previsão de 63.000 mortes em 2030.

O quadro clínico silencioso associado com grande agressividade biológica fazem do Adenocarcinoma de pâncreas uma neoplasia de prognóstico reservado. A baixa taxa de sobrevida associada, que gira em torno de 3-5%, é resultado do diagnóstico tardio no curso da doença. Mais de 85% dos pacientes têm doença extra-pancreática no momento do diagnóstico, com extensão aos órgãos vizinhos, tornando a intervenção cirúrgica relativamente ineficaz nestes casos<sup>(8-9,30)</sup>.

Apesar dos esforços realizados nos últimos anos, o tratamento convencional dispendido, como cirurgia, radiação, quimioterapia ou a associação dos mesmos, tem mostrado pouco impacto no curso da doença. Diferentes fatores estão envolvidos nessa apresentação clínica reservada, tais como: falta de estratégias preventivas efetivas, tanto primárias quanto em programas de rastreamento; o diagnóstico geralmente é feito em estágios avançados da doença, principalmente devido à ausência de sintomas específicos em estágios precoces; inefetividade da abordagem terapêutica e biologia tumoral agressiva, com invasão local precoce e alto potencial metastático<sup>(7-8)</sup>. Segundo Osvaldt et al.<sup>(26)</sup>, apenas 15-20% dos tumores são ressecáveis no momento do diagnóstico. Mesmo pequenos (menores que 1,0 cm), os carcinomas pancreáticos geralmente são fatais<sup>(31)</sup>.

A maioria dos tumores estão localizados na cabeça do pâncreas (60%). Outras localizações incluem o corpo (13%) e cauda (5%). Mais de 21% dos tumores mostram uma infiltração difusa da glândula. Tipicamente apresentam-se como estruturas glandulares com uma marcada reação estromal (desmoplasia), com invasão vascular e perineural precoces, o que confere a esses tumores um alto potencial metastático e invasão local precoces<sup>(13,32)</sup>.

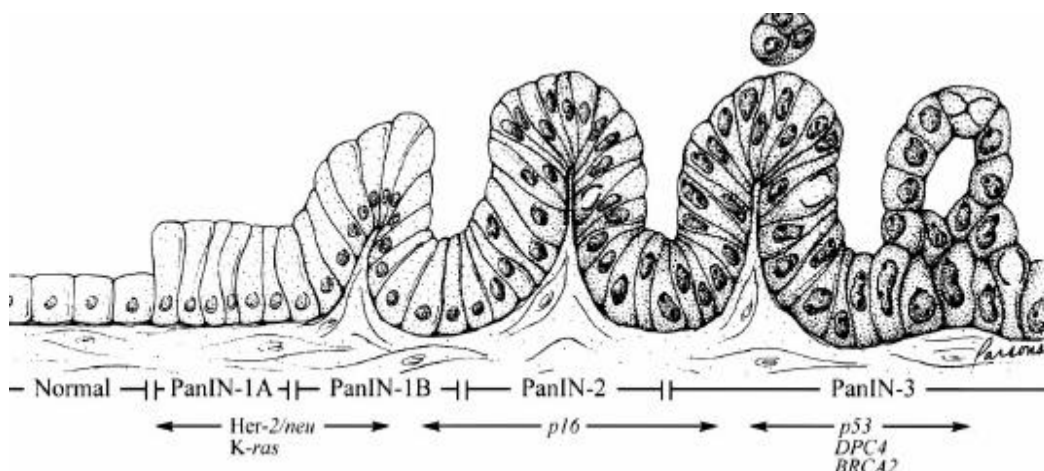
### 2.3.3 Modelo de progressão do Adenocarcinoma Ductal Pancreático e Alterações Moleculares

O adenocarcinoma ductal pancreático parece resultar de uma proliferação intraductal não-invasiva através da progressão das alterações histológicas e moleculares. Nas lesões pré-invasivas, designadas Neoplasia Intra-epitelial

Pancreática (NIPan), o epitélio normal cuboidal plano, que reveste os ductos, é substituído por células colunares mucinosas, planas ou papilares, com variados graus de displasia, e são classificadas baseadas no grau de anormalidades arquiteturais e citológicas<sup>(31-33)</sup>, como seguem abaixo (Figura 6):

- NIPan 1A: lesões proliferativas planas revestidas por um epitélio colunar alto, com núcleos pequenos, redondos a ovais, basais, e abundante mucina supranuclear; sem atipia citológica ou arquitetural;
- NIPan 1B: lesões semelhantes às NIPan 1A, porém com uma arquitetura papilar ou micropapilar, com uma leve pseudoestratificação basal; ainda não há evidência de atipias;
- NIPan 2: lesões planas ou papilares, porém com mais atipias citológicas, como pseudoestratificação nuclear, “nuclear crowding”, perda da polaridade, hipercromasia, aumento nuclear, que conferem displasia de baixo grau; mitoses quando presentes são basais e típicas;
- NIPan 3: lesões com arquitetura papilar mais complexa, padrão micropapilar, com pleomorfismo nuclear acentuado e hipercromasia, nucléolo proeminente; podem apresentar o padrão cribriforme com necrose luminal, células calciformes distróficas; lembram carcinoma pelo padrão citológico porém não se observa invasão da membrana basal. Evidências de que as NIPan são lesões precursoras, que levam ao desenvolvimento da neoplasia invasora, derivam de pesquisas e observações feitas nos últimos anos<sup>(3)</sup>.

**Figura 6 - Modelo de progressão do adenocarcinoma pancreático**



**Fonte:** adaptado de Ardengh, Coelho e Osvaldt, 2008.

Estudos em autópsias revelaram um aumento na prevalência de NIPan com a idade, correspondendo ao aumento da taxa de câncer pancreático nos grupos de pessoas com idade avançada<sup>(34)</sup>. Em espécimes de ressecção com adenocarcinoma ductal pancreático, NIPan estão tipicamente presentes na área ao redor do tumor. NIPan-1 é encontrado em cerca de 75%, NIPan-2 em 65% e NIPan-3 em 50% dos casos<sup>(35)</sup>.

As alterações morfológicas que ocorrem nas Neoplasias Intra-epiteliais Pancreáticas (NIPan) ocorrem paralelas às alterações genéticas<sup>(3,8)</sup>. A maioria das alterações genéticas observadas nas neoplasias invasoras também são observadas nas lesões precursoras, tornando-as assim eventos precoces que levam ao desenvolvimento do tumor. Mutações em oncogenes e em genes supressores tumorais há muito tempo são caracterizadas como um dos eventos mais importantes da carcinogênese<sup>(2,10)</sup>.

Como previsto pelo modelo de progressão, algumas lesões precoces, de baixo grau, como NIPan-1 e NIPan-2, exibem alterações genéticas como encurtamento dos telômeros, ativação na mutação no códon 12 do oncogene KRAS2, inativação do gene supressor tumoral CDKN2A/p16<sup>(1,36-37)</sup>. Mutações no gene KRAS2 tem sido reportadas em 36% a 44% das lesões precursoras de baixo grau, enquanto cerca de 87% das lesões de alto grau são conhecidas por portar este tipo de mutação<sup>(38)</sup>.

Lesões precursoras em estágios mais avançados, de alto grau (NIPan 3) abrigam uma variedade de alterações moleculares adicionais incluindo inativação de genes supressores tumorais como SMAD4 e TP53<sup>(39)</sup>.

A mutação no gene Kras, que atua como mediador do crescimento, proliferação celular e apoptose, é encontrada em cerca de 10-30% nas NIPan-1, 45% nas NIPan-2 e 85% nas NIPan-3 e os tumores que apresentam tal alteração costumam ser mais agressivos e responder menos as terapias padrão<sup>(38,40)</sup>. Nos casos em que ocorre mutação no gene Kras, o mesmo adquire propriedades oncogênicas, passando a atuar no estímulo ao crescimento e à proliferação celular da célula cancerígena, com isso mutações no gene Kras são observadas em até 90% do adenocarcinomas ductais pancreáticos avançados e como uma das primeiras mutações das lesões precursoras<sup>(40)</sup>. Dessa forma, terapias-alvo tem sido desenvolvidas na tentativa de reduzir a atividade do Kras, mas o mesmo tem se mostrado refratário à maioria das estratégias até agora testadas.

Um dos eventos mais precoces que levam à instabilidade genômica na carcinogênese do câncer de pâncreas envolve alteração dos telômeros iniciada por um processo de erosão dos mesmos. Os telômeros estão presentes nas extremidades dos cromossomos e protegem contra a fusão de sequências de DNA de cromossomos diferentes. Um encurtamento extremo dos telômeros leva a formação de pontes na anáfase durante o processo de mitose e conseqüentemente leva à instabilidade numérica e estrutural do genoma. Tal alteração se expressa 90% das lesões intra-epiteliais pancreáticas de baixo grau<sup>(37-38)</sup>. Na verdade, o que acontece especificamente no adenocarcinoma de pâncreas é que o encurtamento dos telômeros observado nas neoplasias intra-epiteliais acaba levando a um aumento da expressão da telomerase por um mecanismo compensatório intracelular, que leva a um enlogamento dos telômeros já na fase mais invasiva do câncer de pâncreas, levando a imortalidade celular<sup>(41)</sup>. A enzima responsável pelo processo, a telomerase, quase não é detectada em células somáticas normais, tornando-a um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos métodos de rastreio<sup>(41)</sup>. Considerando a participação da telomerase na carcinogênese do câncer de pâncreas, o uso de inibidores dessa enzima poderia ter uma resposta significativa em neoplasias malignas do pâncreas.

O TP53, um gene supressor de tumor, é o gene supressor tumoral mais frequentemente inativado em neoplasias sólidas, e é inativado em 55% a 75% das neoplasias pancreáticas invasivas. Mutações no gene TP53 é um evento relativamente tardio na tumorigênese do câncer de pâncreas<sup>(6)</sup>.

Mutações no gene BRCA2, outro gene supressor tumoral, também encontra-se presente na tumorigênese do câncer de pâncreas, porém é descrito como um evento mais tardio na sequência da transformação neoplásica. Portadores de mutações nesse gene apresentam um risco elevado de desenvolvimento não só do câncer de pâncreas como também tumores de mama, ovário e próstata. Alterações genéticas em outros genes com menor prevalência também têm sido descritas<sup>(8,31)</sup>.

A identificação e caracterização destas alterações genéticas presentes nos tumores pancreáticos invasivos e em seus precursores formam uma base para a detecção das mesmas no sangue, urina, fezes, suco pancreático, saliva, etc, e, assim, tornam-se uma ferramenta importante no diagnóstico precoce e conseqüente aumento da sobrevida dos pacientes<sup>(41)</sup>. A taxa de sobrevivência é “estádio-depedente”, portanto, quanto mais cedo for feito o diagnóstico, melhor será a sobrevida destes pacientes e as estatísticas tão alarmantes do câncer de pâncreas podem mudar significativamente<sup>(13,26)</sup>.

#### 2.3.4 Mecanismos genético-moleculares

A caracterização das alterações genéticas e moleculares nos tumores de pâncreas tem permitido uma melhor compreensão do modelo de progressão da doença a nível molecular. A história natural dos tumores pancreáticos mostra um comportamento biológico agressivo e uma taxa acelerada de progressão, conferindo um alto potencial metastático a esses tumores. As células pancreáticas são intrinsecamente químicamente resistentes e, como consequência do acúmulo de diferentes alterações genético-moleculares ao longo do processo de tumorigênese, as células tornam-se ainda mais resistentes a quimioterapia e radioterapia<sup>(3,8)</sup>. Nesse contexto, tem havido recentemente importantes avanços na compreensão da biologia molecular, bem como no diagnóstico, estadiamento e tratamento de pacientes com tumores em estágio inicial. Contudo, mínimos progressos tem sido feitos no que diz

respeito a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento em pacientes com estágio avançado da doença<sup>(2,10)</sup>.

Embora atualmente estejam disponíveis técnicas para identificação do Adenocarcinoma de pâncreas em fase inicial na população em geral, elas são inviáveis, impraticáveis ou ineficazes, face aos seus elevados custos, à baixa incidência desta doença e à difícil localização do órgão (retroperitoneal). Porém, sua utilização poderia ser considerada ao se definir com mais precisão os grupos de risco que mereceriam vigilância<sup>(13,26)</sup>.

Alterações cumulativas sofridas pelas células epiteliais pancreáticas induzem a uma progressiva anormalidade funcional em pontos-chaves como: crescimento celular (ciclo celular, apoptose, fatores de crescimento, receptores e outros elementos dos sinais da transdução); estabilidade genômica (sistema de reparo ao DNA); matriz extracelular e interação com estroma tumoral e angiogênese. Eventos que induzem a carcinogênese e progressão tumoral envolvem mutações em oncogenes, resultando em dominante ganho de função, e mutação ou deleção em genes supressores tumorais com resultante perda de sua ação inibitória<sup>(8,42)</sup>.

Sabe-se, portanto, que o desenvolvimento do carcinoma envolve um acúmulo de alterações genéticas sequenciais e que as células tronco tumorais intrínsecas a DNA celular destes tumores está direta ou indiretamente relacionadas ao comportamento da neoplasia. A evidência mais forte desta sequência vem da análise das lesões precursoras. O modelo de estudo referência das lesões neoplásicas evolutivas é o de Vogelstein et al.<sup>(43)</sup> no carcinoma colorretal, que propõe uma sequência de alterações genéticas cumulativas nas células epiteliais colônicas normais: mutação do gene APC, formação de pólipos adenomatosos com transformação para displasia em graus variados e, finalmente, o adenocarcinoma colorretal. No contexto clínico-morfológico do adenocarcinoma ductal pancreático, observações dão início a um modelo de lesões pancreáticas precursoras intraductais<sup>(31)</sup>. Posteriormente, características morfométricas dos núcleos destas lesões foram encontradas e correlacionadas com o grau de invasividade destas lesões. No entanto, apesar de já se ter conhecimento das lesões pancreáticas pré-neoplásicas desde o século passado, foi no ano de 2001 que Hruban et al.<sup>(32)</sup> publicaram a definição original das neoplasias intra-pancreáticas.

## 2.4 Células tronco no desenvolvimento tumoral

Muitas das neoplasias, mesmo quando diagnosticadas e tratadas em estágio inicial, apresentam depois de alguns anos o que se chama de recidiva tumoral, ou recorrência, que é quando a doença volta a se manifestar. Isso pode ser explicado em parte pela persistência de algumas células tumorais residuais que permanecem e, após algum tempo, podem causar recorrência do tumor, de forma ainda mais agressiva, levando ao aparecimento de metástase. Recentes evidências têm demonstrado que essas células presentes em qualquer fase de progressão do câncer, responsáveis pela resistência terapêutica, crescimento tumoral e recidiva pós tratamento, são chamadas Células tronco tumorais (CTT's). Essas células tem chamado a atenção da comunidade científica para o fato de que, se realmente elas são responsáveis em parte por perpetuar o tumor e interferir na sua resposta terapêutica, elas tornam-se alvo de estudos que identifiquem tais células e proponha por exemplo uma droga alvo-terapêutica, um screening para diagnóstico precoce, revolucionando a compreensão celular a nível molecular durante a progressão do câncer, contribuindo para diminuir a resistência à terapia, prevenindo recorrência ou metástases<sup>(16)</sup>.

Atualmente acredita-se que as neoplasias malignas são resultado de mutações sequenciais que podem ocorrer como consequência de uma progressiva instabilidade genética em conjunto com alterações desencadeadas por fatores ambientais<sup>(44)</sup>. Ao longo dos últimos anos, vem tomando espaço então na literatura o conceito das células tronco tumorais (do inglês *cancer stem cells*, CSCs), as quais poderão ser capazes de modificar a compreensão sobre o processo de carcinogênese e possibilitar a elucidação de algumas controvérsias ainda não bem compreendidas.

As células tronco tumorais (CTT's) pertencem a um grupo diferenciado de células dentro de um tumor com propriedades de auto-renovação e diferenciação. Possuem essas duas importantes propriedades, que é a capacidade de auto-renovação (pela alta capacidade de divisão celular) e diferenciação em uma célula madura. Porém exibem ainda outras características, tais como expressão de telomerase, capacidade de apoptose, aumento no transporte de substâncias via membrana e habilidade de migração celular, levando a possível metástase a

distância, pois elas se “instalam” em outros tecidos levando a diferenciação do tumor de origem<sup>(19)</sup>. Recentes evidências sugerem que as células tronco desempenham um papel crucial não só na geração e manutenção de diferentes tecidos, mas também no desenvolvimento e progressão de certos tipos de tumores<sup>(17)</sup>. Para muitos tumores sólidos, foi demonstrado que eles abrigam uma subpopulação distinta de células tumorais que possuem características de células tronco e, portanto, são chamadas de Células tronco tumorais (CTT's) ou células tumorigênicas<sup>(23)</sup>.

As CTT's possuem, como já citado, certas características semelhantes às das células tronco normais do organismo, como a capacidade de se auto-regenerar e a pluripotência, dando origem a linhagens heterogêneas de células tumorais que formam um mesmo tumor<sup>(45)</sup>. Porém a questão a ser discutida é qual a origem dessas células tronco tumorais, de onde surgiram, por qual gatilho intracelular. Duas hipóteses acerca do assunto já foram levantadas, uma de que as próprias células tronco normais sofreram mutações e se transformaram em células tronco-tumorais, ou uma desdiferenciação de células já diferenciadas, conferindo-lhes pluripotência. Sob condição fisiológica, as células-tronco normais geralmente encontram-se em um estado inativo que é mantido por um microambiente especializado. Mediante o recebimento de um sinal/gatilho estimulante, as células-tronco são ativadas para então se dividir e proliferar. Ao se dividirem, tanto as células tronco normais quanto as tumorais dão origem a dois tipos de células, as que tem propriedade de auto-renovação, que perpetuam e dão origem aos tumores ou tecido normal, e as que se diferenciam, porém não originam o tumor<sup>(19)</sup>. As vias de sinalização autócrina e parácrina, como WNT, Notch, TGF- $\beta$  e receptores de tirosina quinase, estão fortemente associados ao controle de células-tronco tumorais. Qualquer mutação pode fazer com que as células tronco tornem-se indiferentes aos sinais de crescimento ou resistentes ao de anti-crescimento e passem a proliferação desordenadamente, sem controle, com conseqüente desenvolvimento tumoral.

Com a expansão clonal, as células tronco embrionárias se diferenciam para outros tipos celulares e perdem as suas características de células-tronco. Entretanto, parte dessas células permanece em seu estado original, e acredita-se que sejam essas células que mantém o crescimento tumoral e que determinam a resistência a



diversos esquemas terapêuticos<sup>(46)</sup>. As CTT's parecem ser essenciais para a progressão do tumor e a aquisição do potencial metastático.

Por definição, células tronco tumorais tem características semelhantes às das células-tronco normais, principalmente no que diz respeito à capacidade de originar qualquer um dos tipos de células encontradas nos tecidos. Podem se dividir e originar várias células que constituem os tumores, perpetuando assim seu crescimento e ainda oferecendo resistência, por mecanismos ainda não bem esclarecidos, ao tratamento quimioterápico. Por conta disso, representam um importante alvo de pesquisas em diversos países. Segundo citação de Maria Ana Duhagon, professora no Laboratório de Interações Moleculares da Faculdade de Medicina da *Universidad de la República* - UDELAR<sup>(47)</sup>

As células cancerígenas não são sempre iguais. Em um tumor maligno pode haver uma variedade de tipos de células e a ideia das células-tronco tumorais é que, entre as células do câncer, algumas atuem como células-tronco que se reproduzem e sustentam o câncer, de forma semelhante à que células-tronco normais se derivam em órgãos e tecidos. As células-tronco tumorais têm grande interesse clínico por estarem envolvidas na metástase e na resistência às drogas, prejudicando tratamentos como a quimioterapia.

O processo de tumorigênese, até o que se conhece e está elucidado pela literatura atual, envolve a aquisição progressiva de múltiplas mutações aberrantes que culminam com a expansão e proliferação de subpopulações celulares mais agressivas, contribuindo para a progressão e crescimento tumoral. Apesar desta teoria estar bem estabelecida, a identificação das células que são capazes de originar o tumor ainda é alvo de muitos estudos para melhor caracterização do processo de carcinogênese e identificação destas células. As células com essas habilidades de se auto-proliferarem e originarem novos tumores ou somente induzir o crescimento de um tumor já existente, são denominadas de células-tronco tumorais e compartilham muitas características com sua contraparte normal. Ambas as células, tumorais e células tronco normais, são capazes de se auto-renovarem, mantendo a população de células-tronco indefinidamente, e de gerarem células capazes de se diferenciarem em pelo menos uma linhagem específica, quando não ainda originar tumores com mais de uma linhagem, como é o caso por exemplo de Carcinossarcomas, que exibem uma linhagem de origem epitelial e outra

mesenquimal. A diferenciação, que é a transformação de um tumor inicialmente indiferenciado em uma histogênese epitelial, mesenquimal., é acompanhada de diminuição da taxa proliferativa, as células mais diferenciadas são incapazes de manter a proliferação e tendem, após certo tempo, a iniciar o programa de apoptose. Desta forma, muitas das células que compõem a massa tumoral não são tumorigênicas. Isso leva ao conceito de que um tumor exibe células em diferentes estágios de proliferação e diferenciação, contribuindo para a população heterogênea tumoral<sup>(16)</sup>.

Quanto à progressão tumoral, duas propriedades intrínsecas das células-tronco são de extrema relevância: baixa taxa proliferativa quando tumores mais diferenciados e alta expressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas. Tais características implicam imediatamente na baixa eficiência na eliminação destas células por meio de quimioterapia convencional, que tem como alvo preferencial células em estágio proliferativo. Desta forma, a identificação de vias moleculares diferencialmente ativadas nas células-tronco tumorais, bem como o entendimento do microambiente tumoral, poderá levar ao desenvolvimento de terapias alvo-específicas, menos agressivas e mais hábeis em induzir apoptose nas células que sustentam a população tumoral, diminuindo a incidência de recaídas<sup>(19)</sup>. Analisando a hipótese de que as CTT's pertencem a uma subpopulação de células resistentes, é possível que estas células sejam: ou quiescentes e sem divisão, conferindo-lhes assim sua insensibilidade, ou são proliferativas, porém insensíveis a quimioterapia por ativação de mecanismos de resistência<sup>(48)</sup>.

Desde a identificação das células-tronco do sistema hematopoiético há várias décadas, mudou-se a forma de abordar e compreender o processo de carcinogênese. Tumores sólidos contêm uma subpopulação distinta de células que têm características de células-tronco e são exclusivamente responsáveis pelo tumorigenicidade. Esta descoberta conduziu ao desenvolvimento do conceito de células tronco tumorais, que propõe que uma subpopulação de células com poder de auto-regeneração seriam responsáveis pela tumorigênese de uma neoplasia e seu potencial metastático. Isto contrasta com o modelo de carcinogênese por muito anos discutido e ainda sustentado por diversos autores, no qual todas as células tumorais são capazes de iniciação do tumor, constituindo uma população homogênea. É importante ressaltar que as células-tronco tumorais não são apenas capazes de

auto-regeneração e diferenciação, mas também interferem no sistema imunológico e promovem a resistência a múltiplas drogas<sup>(16,49)</sup>.

O modelo clássico da carcinogênese sugere que os tumores são biologicamente homogêneos, e a maioria das células que o compõe são equivalentemente malignas. Outra visão é que o câncer é composto por uma população heterogênea de células com diferentes potenciais proliferativos e respostas terapêuticas<sup>(50)</sup>. A hipótese das células tronco é um modelo fundamentalmente diferente de carcinogênese, que envolve dois processos distintos, mas dependentes um do outro, que inclui a ativação aberrante de seus processos estritamente regulados de auto-regeneração e diferenciação e sua resistência intrínseca à radio e quimioterapia<sup>(49)</sup>.

Com base no princípio de que os tumores em geral têm em comum uma taxa de crescimento e proliferação excessiva, desordenada, e de que células mais diferenciadas têm menor taxa de divisão, foram desenvolvidas abordagens terapêuticas como a indução da diferenciação e a destruição dessas células diferenciadas, porém nenhuma dessas abordagens pode garantir completamente a cura do câncer uma vez que uma quantidade mínima de CTT's que permaneça no tecido pode levar à recaída da doença. O alvo neste caso seriam as células tronco-tumorais, porém na prática clínica ainda não é possível diferenciá-las das células normais ou usar uma droga que atinja apenas a via de crescimento de uma delas, uma vez que elas compartilham várias etapas envolvidas na auto-renovação<sup>(51)</sup>.

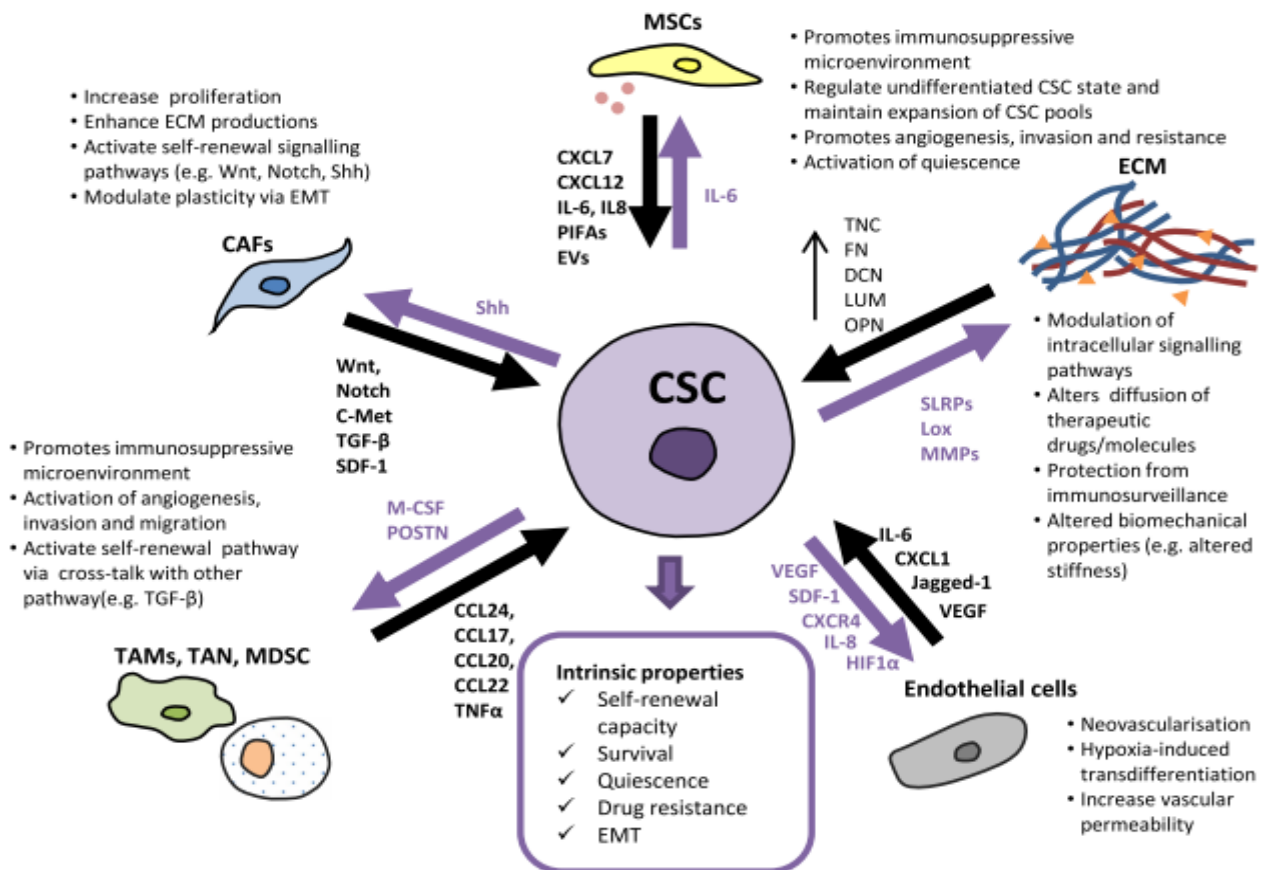
À medida que o tumor se desenvolve e cresce, torna-se cada vez mais importante para as células cancerígenas sustentarem seu crescimento e funções adquiridas através da formação de um ambiente tumoral, recrutando componentes celulares e modulando sua matriz extracelular. A angiogênese (neoformação vascular) é uma das formas do tumor manter seu crescimento, pois a medida que ele cresce, a oferta de oxigênio diminui devido ao aumento do tamanho tumoral, levando à hipóxia, em resposta a essa injúria há a formação de novas estruturas vasculares para facilitar a difusão de nutrientes e oxigênio para as células cancerígenas, através processo do processo conhecido como angiogênese<sup>(52)</sup>. Como mecanismo de adaptação, as CTT's podem interagir com seu microambiente para modular seu estado de sobrevivência, crescimento e poder metastático, inseridas em um contexto “estressante” para a célula tumoral em si por estar sob a

pressão de uma terapêutica anti-tumoral na maioria das vezes agressiva, tornando o ambiente desfavorável para seu crescimento.

As células tronco tumorais influenciam as células estromais circunjacentes e as células do sistema imune, secretando sinais transdutores que alteram a função e atividade dessas células circundantes, o que, por sua vez, facilita a progressão tumoral mesmo que em um ambiente desfavorável resultante de quimioterápicos e moduladores.

A figura 7 mostra as interações entre as células tronco tumorais (CTT's) e o microambiente em que estão inseridas:

**Figura 7 - Interações entre células troco tumorais (CTT's)**



Fonte: Ayob e Ramasamy, 2018.

#### 2.4.1 Papel das células tronco tumorais no comportamento do câncer de pâncreas

As primeiras evidências das células tronco tumorais foram descritas nas leucemias em um estudo publicado por Bonnet e col. em 1997, o qual demonstrou que um grupo específico de células tumorais foi capaz de replicar tumores *in vitro* com muita facilidade<sup>(49)</sup>. Posteriormente, células tronco tumorais foram identificadas em tumores sólidos. Desde então já foram identificadas em tecidos tumorais de neoplasias como mama, pulmão, próstata, ovário, cérebro, melanoma, estômago, cabeça e pescoço, e estão associadas a quimio e radioresistência que leva à falha de terapias tradicionais<sup>(53)</sup>.

Alguns marcadores de células tronco-tumorais já foram testados em células de câncer de pâncreas. As células de adenocarcinoma do pâncreas que expressam os marcadores CD24+ e CD44+, separadas por citometria de fluxo, comparadas às células CD24-CD44-, apresentaram potencial tumorigênico 20 vezes maior em camundongos imunossuprimidos. A heterogeneidade tumoral também pode contribuir para vários tipos de células-tronco do câncer de pâncreas, na maioria ainda não identificadas. Ainda não está claro se CTT's fenotipicamente semelhantes de dois pacientes têm as mesmas características e agem da mesma maneira no desenvolvimento da doença<sup>(54)</sup>.

A agressividade intrínseca ao câncer de pâncreas, com uma alta capacidade de invasão local, alto potencial metastático, diagnóstico tardio e resistência terapêutica, parecem relacionar-se, em parte, à população de CTT's que fazem parte deste tumor<sup>(49)</sup>. Além disso, tem sido mostrado que o adenocarcinoma ductal pancreático não contém apenas uma população homogênea de células tronco tumorais, mas sim subpopulações diversas que podem estar envolvidas na progressão tumoral. Até o presente momento, as células-tronco do câncer de pâncreas identificadas constituem uma minoria das células componentes do tumor, cerca de 1% -5%, e têm alta capacidade de auto-renovação<sup>(50)</sup>. O aspecto clínico mais importante, no entanto, é a observação de que essas células tronco tumorais são altamente resistentes à quimioterapia e radioterapia, resultando em resistência e recorrência rápida da doença. Um dos grandes desafios da oncologia atual é identificar e estudar as características dessas CTT's, especialmente no Adenocarcinoma pancreático, no qual poucas descobertas foram feitas<sup>(55)</sup>.

Estudos recentes já comprovaram que as CTT's são resistentes à radiação ionizante usada na radioterapia. Conforme citado por Rich<sup>(56)</sup>, o marcador de células CD133 identificado nas células do glioblastoma foram submetidas a radiação, que sobreviveram a doses altas de radioterapia em comparação com a maioria das células CD133 negativas, sendo portanto capazes de regenerar o tumor. A investigação de danos ao DNA nessas duas linhagens de células mostrou serem semelhantes, mas nas células CD133 positivo o defeito ao DNA foi reparado com mais eficiência e havia menos apoptose.

#### 2.4.2 Marcadores para identificação de células tronco tumorais na prática clínica

Atualmente na prática clínica dispomos hoje de muitos marcadores de rastreamento de neoplasias, como por exemplo o CA19.9 para tumores de via biliares, CA125 para ovário, antígeno prostático (PAS) para próstata, sendo as formas mais comumente usadas para investigar a doença. Mas tais marcadores originam-se de células já diferenciadas intrínsecas do tumor. No entanto, as CTT's estão presentes bem no início do processo de carcinogênese, o que permitiria um diagnóstico precoce caso elas pudessem ser identificadas.

Vários biomarcadores têm sido utilizados para identificar células tronco tumorais em muitos tipos de câncer: CD34CD38 para leucemia mieloide aguda, CD44, CD24 e ALDH para câncer de mama, CD133 para ovário, cérebro, pulmão e próstata, CD44 para cabeça e pescoço, CD44, ALDH1 para câncer de cólon. No entanto, não existe um marcador universal de células tronco tumorais, o que se tem hoje são alguns marcadores já conhecidos por estarem expressos em vários tipos de tumores, como o CD133 por exemplo, marcador mais comumente encontrado nos tumores. A heterogeneidade das células tumorais faz com que cada tumor expresse de maneira diferente tal marcador de célula tumoral<sup>(57)</sup>.

Recentemente, alguns marcadores de superfície específicos de células tronco têm sido descritos em células de câncer de pâncreas, como o CD133, CD24, CD44 e outros, porém seu uso na prática clínica ainda é controverso e estudos adicionais são necessários<sup>(23)</sup>. Em câncer de pâncreas, um estudo recentemente publicado avaliou a expressão de diferentes marcadores de CTT's (CD133, Nestin, Notch1-4, Jagged1 and 2, ABCG2 e ALDH1) em tecido tumoral por imunohistoquímica, mas

não encontrou associação prognóstica significativa, exceto para o marcador Notch3 que se correlacionou com estádios mais avançados<sup>(58)</sup>. Por razões não descritas no estudo, os marcadores CD24 e CD44, tipicamente associados ao perfil de CTT's pancreáticas em estudos *in vitro*<sup>(20,59)</sup>, não foram avaliados por Vizio et al.<sup>(58)</sup>.

Hermann et al.<sup>(60)</sup> relataram a presença de CTT's em tecido pancreático tumoral através da expressão de CD133, e que são células exclusivamente tumorigênicas e altamente resistentes ao tratamento quimioterápico padrão<sup>(60)</sup>. No entanto, no estudo de Mizuno et al.<sup>(61)</sup> as células tumorais foram negativas para CD133<sup>(61)</sup>. O autor do último estudo atribuiu a discrepância entre os estudos devido a sensibilidade do anticorpo anti-CD133 utilizado ou ainda a artefatos de fixação do material.

No câncer de mama, as células neoplásicas com características de células tronco mais estudadas são aquelas que expressam fortemente o CD44 e que tem expressão baixa ou ausente de CD24 (imunofenótipo CD44+CD24-)<sup>(62)</sup>. Essas células neoplásicas CD44+CD24- são 100 vezes mais tumorigênicas do que as células que não exibem esse imunofenótipo<sup>(63)</sup>. Células com imunofenótipo CD44+CD24- estão presentes em 20 a 30% dos carcinomas mamários humanos. Esses carcinomas são agressivos, apresentando alta incidência de metástases, sobretudo metástases ósseas<sup>(64)</sup>. Células do câncer de próstata com o mesmo fenótipo CD44+ e CD24- possuem essa "assinatura genômica" como fator preditivo de pior prognóstico em pacientes com câncer de próstata<sup>(65)</sup>, bem como a expressão de CD44+ relaciona-se com a progressão tumoral do câncer colo-retal<sup>(66)</sup>.

O CD24 é expresso em malignidades hematológicas, assim como em uma grande variedade de tumores sólidos, e é na maioria das vezes associado com um curso mais agressivo da doença. No câncer de pâncreas, Sagiv, Kazanov e Arber<sup>(67)</sup> sugeriram uma relação com a progressão da doença, porém sem obtenção de significância estatística. O marcador CD24 é altamente expresso em adenocarcinomas em comparação com carcinomas do cólon e da mama, além de se correlacionar com ocorrência de metástases linfonodais; estudos com adenocarcinomas de vesícula biliar e ovário também demonstraram associação com a expressão de CD24<sup>(68)</sup>.

O CD133, outro marcador de superfície expresso por CTT's, tem sido usado para detectar células tronco tumorais em câncer de mama<sup>(69)</sup>, sistema nervoso

central<sup>(70)</sup>, fígado<sup>(71)</sup>, cólon<sup>(72)</sup>, próstata<sup>(73)</sup> e, mais recentemente, em câncer de pâncreas<sup>(74)</sup>. Em hepatocarcinomas, a expressão de células CD133 positivas associou-se a tumores em estádios mais avançados e, em tumores colo-retais, associou-se com alto potencial metastático, resistência ao tratamento e pior prognóstico<sup>(75)</sup>. Segundo Saigusa et al.<sup>(76)</sup>, a recidiva à distância é a principal causa de mortalidade em pacientes com câncer retal com radioterapia pré-operatório. Expressão de CD133 e Oct4 pode prever recorrência a distância, ocorrência de metástase e pior prognóstico em pacientes com câncer retal tratados com quimio e radioterapia pré-operatórios.

Em estudo em tumores do sistema nervoso central, um pequeno conjunto de 100 células CD133+ reproduziram em ratos um tumor igual ao original, enquanto 100.000 células de CD133- não puderam fazer o mesmo. Outros experimentos com animais identificaram a mesma situação, em que uma pequena quantidade de células tronco tumorais é capaz de dar origem a um tumor enquanto que é necessário milhares de células tumorais para obter o mesmo resultado<sup>(49)</sup>. Em Gliomas, tumores do sistema nervoso central, a proporção de células positivas para CD133 foi um fator de risco independente para o crescimento do tumor e progressão para graus 2 e 3 da WHO - Organização Mundial da Saúde, que possuem pior prognóstico<sup>(77)</sup>.

Ricci-Vitiani et al.<sup>(25)</sup> participaram de um estudo onde observou-se a presença de célula tronco tumoral CD133 nas células do câncer colorretal. Estas células identificadas, uma vez injetadas no subcutâneo de ratos imunodeficientes, foram capazes de reproduzir tumores com as mesmas características do tumor original, o que em contrapartida não foi obtido quando as células eram CD133 negativas. Estudo semelhante mostrou a mesma correlação entre crescimento tumoral e células CD133+ em tecido renal, reproduzindo células diferenciadas idênticas a do tumor original.

Por fim, o *OCT4*, gene envolvido na rota carcinogênica das CSCs, parece ser extremamente necessário para a manutenção da pluripotencialidade e auto-regeneração das células tronco<sup>(78)</sup>. Em estudos com câncer de esôfago, a expressão da proteína Oct4 foi significativamente associada com maior grau histológico e pior sobrevida, indicando que este marcador de auto-regeneração pode estar envolvido em desfechos clínicos negativos nesses tumores<sup>(79)</sup>. Tumores de bexiga também



mostraram uma relação com alta expressão de Oct-4, considerado potencialmente como um novo marcador molecular de tumores da bexiga, e a sua identificação pode indicar a existência de células tronco tumorais nestes tumores.

Desde então, células tronco tumorais começaram a fazer parte do processo de carcinogênese e associação com tumores de pior prognóstico, ou que apresentam uma alta taxa de crescimento (o que é considerado pelo número aumentado de mitoses no tumor).

#### 2.4.3 Análise imunohistoquímica por *Tissue Microarray* (TMA)

O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *Tissue Microarray* (TMA), é uma técnica primeiramente descrita por Kononen et al.<sup>(80)</sup> e constitui uma grande ferramenta para a patologia investigativa. Trata-se de agrupar em um único bloco um número razoável de amostras teciduais, permitindo assim o estudo da expressão imunohistoquímica de marcadores moleculares, com grande aproveitamento do material, presença de controle interno, e tempo e custos efetivos. Esta técnica permite ainda a uniformização das reações, representatividade eficiente através da utilização de diferentes áreas do tumor, estudo de grande número de amostras simultaneamente, facilidade de interpretação e pesquisa em larga escala de fatores prognósticos ou preditivos de neoplasia.

Primeiramente seleciona-se os blocos doadores, os quais devem apresentar uma boa qualidade do material, e também boa representatividade, o que é definido a partir da análise da lâmina em HE arquivada. Seleciona-se, então, a área relevante para a confecção do bloco de TMA para avaliar a exata representação do tecido/neoplasia residual no bloco doador, marcando-se então a área a ser estudada pelo TMA. Usando agulhas de 0,8 milímetros, punciona-se a área escolhida e inserem-se cilindros em um bloco de parafina, dispondo-os de modo padronizado. Os mapas da matriz escolhida são estabelecidos com as marcas do equipamento e com distâncias entre os cilindros. Cortes histológicos em micrótomo convencional são feitos então a partir deste bloco receptor e as lâminas são confeccionadas. Testes pilotos são feitos para determinar as diluições conforme o fabricante do anticorpo e determinando também o padrão de positividade em lâminas de controle, conforme indicação do fabricante e dentro das condições do laboratório com

(controle positivo) e sem o anticorpo primário (controle negativo). São realizados cortes de quatro micrômetros de espessura postos em lâminas com carga elétrica e mantidas em estufa a 60°C overnight. As lâminas são identificadas e desparafinadas em xilol e, então, passadas em álcool etílico em concentração decrescente (100%, 85% e 75%) e lavadas em água corrente por cinco minutos. A recuperação antigênica é realizada seguindo as recomendações de tempo e pH fornecidas pelo fabricante utilizando o equipamento (DAKO®). Após a recuperação antigênica, a peroxidase endógena será bloqueada e em seguida os cortes serão incubados com bloqueador de proteínas (DAKO®) por cinco minutos, a temperatura ambiente e em câmara úmida.

Os cortes serão incubados com o anticorpo primário por 90 minutos à temperatura ambiente e posteriormente incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, os cortes serão incubados com cromógeno por 5 minutos e então lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina. Em seguida, as lâminas serão lavadas em água corrente, desidratadas e montadas com bálsamo e lamínula para análise microscópica. Será feita também uma lâmina na coloração habitual de hematoxilina-eosina<sup>(81)</sup>.

### 3. MARCO CONCEITUAL



#### 4. JUSTIFICATIVA

Já está documentado que existe uma necessidade clara e emergencial de investimento na área de pesquisa clínica visando esta expectativa dramática de aumento da taxa de mortalidade por câncer pâncreas nos próximos 10-20 anos. Investimentos em pesquisas que levem a uma compreensão e identificação da carcinogênese e desenvolvimento tumoral, na busca por ferramentas que auxiliem em um diagnóstico precoce, seja por meio de biomarcadores ou por exames de imagem de alta resolução, na busca de estratégias de diagnóstico e alvos terapêuticos, afim de reduzir esses dados alarmantes para os próximos anos.

Nesse contexto, a pesquisa e caracterização de células tronco tumorais é crucial para o melhor entendimento do câncer de pâncreas enquanto doença. Muitas das informações que obtemos e utilizamos para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias pancreáticas deriva de populações heterogêneas, com diferentes graus de maturação e diferenciação. Cada vez mais se torna urgente a caracterização das CSCs para a avaliação e caracterização da rota carcinogênica dos tumores mais agressivos. A consequência direta é o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que consigam atuar sobre as CSCs e a possibilidade de determinar, por um método de fácil acesso, quais pacientes mais se beneficiarão desse tipo de tratamento. Essas estratégias deverão considerar a especificidade dos marcadores das células tronco, que as tornam resistentes aos quimioterápicos. Análises conduzirão à compreensão de importantes propriedades biológicas dessas células, proporcionando assim um melhor entendimento do seu papel no câncer de pâncreas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo primário**

O principal objetivo é o estudo de biomarcadores em câncer de pâncreas, por meio da identificação de alterações moleculares ainda pouco caracterizadas no adenocarcinoma pancreático. Para isso, analisaremos o perfil de expressão de marcadores de CSCs, conforme objetivos específicos, nas células de adenocarcinoma ductal pancreático por técnica de imunohistoquímica *Tissue Microarray* (TMA).

### **5.2 Objetivos secundários**

- Analisar o perfil de marcação de células tumorais de Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) pelos anticorpos CD24, CD133 e Oct4 utilizando *tissue microarray* em peças provenientes de resseção pancreática (pancreatectomias ou duodenopancreatectomias) e biópsias;
- Correlacionar os achados imunohistoquímicos com dados clínicos, resposta terapêutica, sobrevida global e livre de doença dos pacientes incluídos no estudo, a fim de determinar o papel prognóstico dos marcadores anteriormente descritos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(8): 2969-72.
2. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *New Engl J Med.* 2010; 362(17): 1605-17.
3. Hruban RH, Adsay NV. Molecular classification of neoplasms of the pancreas. *Hum Pathol.* 2009; 40(5): 612-23.
4. Gnoni A, Licchetta A, Scarpa A, Azzariti A, Brunetti AE, Simone G, et al. Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(10): 19731-62.
5. Barbosa IR, Santos CA, Souza DLB. Pancreatic cancer in Brazil: mortality trends and projections until 2029. *Arq. Gastroenterol.* 2018; 55(3): 230-236.
6. Ottenhof NA, Milne AN, Morsink FHM, Drillemburg P, Ten Kate FJ, Maitra A. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: of mice and men. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133(3): 375-81.
7. Weltman E, Salvajoli JV, Hanriot RM, Prisco FE, Oliveira SN, Cruz JC, et al. Radioterapia em adenocarcinoma de pâncreas. *Rev Assoc Med Bras.* 2002; 48(2): 118-28.
8. Soto JL, Barbera VM, Saceda M, Carrato A. Molecular biology of exocrine pancreatic câncer. *Clin Transl Oncol.* 2006; 8(5): 306-12.
9. Sakorafas GH, Tsiotou AG, Tsiotou GG. Molecular biology of pancreatic câncer; oncogenes, tumor suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer Treat Rev.* 2000; 26(1): 29-52.

10. Ranganathan, P; Harsha, HC; Pandey, A. Molecular alterations in exocrine neoplasms of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133(3): 405-408.
11. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic Cancer. *The Lancet.* 2011; 378(9791): 607-620.
12. Wörmann, S.M.; Algül, H. Risk Factors and Therapeutic Targets in Pancreatic Cancer. *Front Oncol.* 2013; 3(282).
13. Ardengh JC, Coelho N, Osvaldt AB. Câncer do pâncreas em fase inicial: é possível identificá-lo através dos instrumentos científicos e propedêuticos atualmente disponíveis? *Arq Gastroenterol.* 2008; 45(2): 169-77.
14. Tysnes BB, Bjerkvig R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *BBA- Rev cancer.* 2007; 1775(2): 283-97.
15. Allegra E, Trapasso S. Cancer stem cells in head and neck cancer. *OncoTargets Ther.* 2012; 5: 375-383.
16. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci.* 2018; 25(20).
17. Balic A, Dorado J, Alonso-Gómez M, Heeschen C. Stem cells as the root of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Cell Res.* 2012; 318(6): 691-704.
18. Fang Y, Yao Q, Chen Z, Xiang J, William FE, Gibbs RA, et al. Genetic and molecular alterations in pancreatic cancer: implications for personalized medicine. *Med Sci Monit.* 2013; 19: 916-26.
19. Kobayashi NC, Noronha SM. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. *Rev Assoc Med Bras.* 2015; 61(1): 86-93.

20. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1030-7.
21. Kumagai T, Akagi T, Desmod JC, Kawamata N, Gery S, Imai Y, et al. Epigenetic regulation and molecular characterization in pancreatic cancer cells. *Inst J Cancer.* 2009; 124(4): 827-33.
22. Dorado J, Lonardo E, Miranda-Lorenzo I, Heeschen C. Pancreatic cancer and stem cell: new insights and perspectives. *J Gastroenterol.* 2011; 46(8): 956-73.
23. Matsuda Y, Kure S, Ishiwata T. Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer. *Med Mol Morphol.* 2012; 45(2): 59-65.
24. Koutsounas I, Giaginis C, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors and pancreatic cancer: are there any promising clinical trials? *World J Gastroenterol.* 2013; 19(8): 1173-81.
25. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007; 445(7123): 111-15.
26. Osvaldt AB, Vanin GF, Backes NA, Vanni GF, Backes AN, Costa MSB, et al. Ressecções pancreáticas: Experiência do Grupo de Fígado, Vias Biliares e Pâncreas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 2000 e 2003. *HCPA.* 2004; 24(1): 13-27.
27. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007; 128(4): 693-705.
28. Instituto Nacional de Câncer José alencar Gomes da Silva. Tipos de câncer: pâncreas [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>



29. Moraes, VM. Evolução do padrão alimentar e tendência da mortalidade por câncer de pâncreas nas capitais do Brasil, 1980-1997 [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2002.
30. Jemal A, Siegel IR, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58(2): 71-96.
31. Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas.* 2004; 28(3): 257-62.
32. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(5): 579-86.
33. Hruban RH, Klimstra DS, Pitman MB. Tumors of the pancreas. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 2007. (Atlas of tumor pathology; 4 series, fascicle 6)
34. Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res.* 1976; 36: 2690-2698.
35. Andea A, Sakar F, Adsay NV. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2003; 16(10): 996-1006.
36. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* 1988; 53: 549-54.
37. Van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* 2002; 161(5): 1541-7.

38. Lohr M, Kloppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Luttges, J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasia associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 2005; 7(1): 17-23.
39. Maitra A, Adsay NV, Argani, P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol*. 2003; 16(9): 902-12.
40. Li D, Jiao L. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer*. 2003; 33(1): 3-14.
41. Nakashima A, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Hashimoto Y, et al. Usefulness of human telomerase reverse transcriptase in pancreatic juice as a biomarker of pancreatic malignancy. *Pancreas*. 2009; 38(5): 527-33.
42. Sitek B, Sipos B, Alkatout I, Poschmann G, Stephan C, Schulenburg T, et al. Analysis of the pancreatic tumor progression by a quantitative proteomic approach and immunohistochemical validation. *J Proteome Res*. 2009; 8(4): 1647-56.
43. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988; 319(9): 525-32.
44. Oliveira LR, Jeffrey S, Ribeiro-Silva AR. Stem cells in human breast cancer. *Histol Histopathol*. 2010; 25(3): 371-85.
45. Mei-Hui T, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2005; 26(2): 495-502.

46. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98(24): 1777-85.
47. Shimizu H. Células-tronco de tumores podem ajudar no combate ao câncer [Internet]. São Paulo: EXAME; nov 2016. Disponível em: <https://exame.abril.com.br/ciencia/celulas-tronco-de-tumores-podem-ajudar-no-combate-ao-cancer/>
48. Ye J, Wu D, Wu P, Chen Z, Huang J. The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. *Tumour Biol.* 2014; 35(5): 3945-51.
49. Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res.* 2012; 2(3): 340-56.
50. Ansari D, Chen BC, Dong L, Zhou MT, Andersson R. Pancreatic cancer: translational research aspects and clinical implications. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(13): 1417-24.
51. Sell S. Stem cells and cancer: an introduction. In: Majumder S, editor. *Stem cells and cancer.* New York: Springer; 2009. p. 1-26.
52. Lau EY, Ho NP, Lee TK. Cancer stem cells and their microenvironment: biology and therapeutic implications. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 1-11.
53. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 10946-51.
54. Li J, Wientjes G, Au JL. Pancreatic cancer: pathobiology, treatment options, and drug delivery. *AAPS J.* 2010; 12(2): 223-32.

55. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005; 65(13): 5506-11.
56. Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res.* 2007; 67(19): 8980-4.
57. O'Brien CA, Kreso A, Jamieson HM. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(12): 3113-20.
58. Vizio B, Mauri FA, Prati A, Trivedi P, Giacobino A, Novarino A, et al. Comparative evaluation of cancer stem cell markers in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 2012; 27(1): 69-76.
59. Zhang Y, Wei J, Wang H, Xue X, An Y, Tang D, et al. Epithelial mesenchymal transition correlates with CD24+CD44+ and CD133+ cells in pancreatic cancer. *Oncol Rep.* 2012; 27(5): 1599-605.
60. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007; 1(3): 313-23.
61. Mizuno N, Yatabe Y, Hara K, Hijioka S, Imaoka H, Shimizu Y, et al. Cytoplasmic expression of LGR5 in pancreatic adenocarcinoma. *Front Physiol.* 2013; 4: 269.
62. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(3): 1154-9.
63. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(7): 3983-8.

64. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006; 8(5): R59.
65. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. CD44+ CD24 (-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer.* 2008; 98(4): 756-65.
66. Wielenga VJM, Heider K-H, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 1993; 53(20): 4754-56.
67. Sagiv E, Kazanov D, Arber N. CD24 plays an important role in the carcinogenesis process of the pancreas. *Biomed Pharmacother.* 2006; 60(6): 280-4.
68. Lim SC, Oh SH. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract.* 2005; 201(7): 479-86.
69. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(1): R10.
70. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(18): 5821-8.
71. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351(4): 820-4.

72. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445: 106-10.
73. Shepherd CJ, Rizzo S, Ledaki I, Davies M, Brewer D, Attard G, et al. Expression profiling of CD133+ and CD133-epithelial cells from human prostate. *Prostate*. 2008; 68(9): 1007-24.
74. Maeda S, Shintani H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, et al. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2008; 98(8): 1389-97.
75. Horst DL, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008; 99(8): 1285-89.
76. Saigusa S, Tanaka K, Toyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Am Surg Oncol*. 2009; 16(12): 3488-98.
77. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, et al. Stem Cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(1): 123-9.
78. Iki K, Pour PM. Expression of Oct4, a stem cell marker, in the hamster pancreatic cancer model. *Pancreatol*. 2006; 6(4): 406-413.
79. He W, Li K, Wang F, Qin YR, Fan QX. Expression of OCT4 in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(7): 712-719.

80. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998; 4(7): 844-7.

81. Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(1): 55-50.

### **Bibliografia complementar**

Almadi MA, Alharbi O, Azzam N, Altayeb M, Javed M, Alsaif F, et al. Clinical predictors of resectability of pancreatic adenocarcinoma. *J Gastroenterol.* 2013; 19(6): 278-85.

Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer.* 2007; 120(7): 1598-1602.

Ausborn NL, Wang T, Wentz SC, Washington MK, Merchant NB, Zhao Z, et al. 53BP1 expression is a modifier of the prognostic value of lymph node ratio and CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2013; 13:155.

Bacelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol.* 2012; 198(3): 281-93.

Cancer Facts and Figures 2008. Estimated New Cancer Cases and Deaths. American Cancer Society; 2008.

Canto MI, Goggins M, Yeo CJ, Griffin C, Axilbund JE, Brune K, et al. Screening for pancreatic neoplasia in high-risk individuals: an EUS-based approach. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004; 2(7): 606-21.

Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(4): 275-84.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors and patient outcome. *Cancer Res.* 2009; 69(9): 3802-09.

Feinberg, AP. Cancer epigenetics take center stage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(2): 392-94.

Furasté, PA. Normas técnicas para o trabalho científico. Explicitação das Normas da ABNT. 13 ed. Porto Alegre; 2009.

Gallmeier E, Bader DC, Kriegl L, Berezowska S, Seeliger H, Göke B, et al. Loss of TRAIL-receptors is a recurrent feature in pancreatic cancer and determines the prognosis of patients with no nodal metastasis after surgery. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56760.

Grassadonia A, Cioffi P, Simiele F, Iezzi L, Zilli M, Natoli C. Role of Hydroxamate-Based Histone Deacetylase Inhibitors (Hb-HDACIs) in the Treatment of Solid Malignancies. *Cancers (Basel).* 2013; 5(3): 919-42.

Immervoll H, Hoem D, Sakariassen P, Steffensen OJ, Molven A. Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer.* 2008; 8: 48.

Instituto Nacional do Câncer. Ações de enfermagem no controle do câncer. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA; 2002.

Juliano CN, Izetti P, Pereira MP, Santos AP, Bravosi CP, Abujamra AL, et al. H4K12 and H3K18 acetylation associates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016; 24(5): 337-44.



König A, Linhart T, Schlegelmann K, Reutlinger K, Wegele J, Adler G, et al. NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells. *Gastroenterology*. 2010; 138(3): 1189–99.

Kristiansen G, Winzer KW, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(13): 4906-13.

Lehrmann H, Pritchard L, Harel-Bellan A. Histone acetiltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv cancer Res*. 2002; 86: 41-65.

Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*. 2006; 66(9): 4553-7.

Lund AH, Lohuizen MV. Epigenetics and cancer. *Genes Dev*. 2004; 18: 2315-35.

Magalhães GM, Terra EM, Calazans SG, Vasconcelos RO, Alessi AC. Avaliação da imunomarcagem de células-tronco tumorais em carcinossarcomas mamários e carcinomas em tumores mistos em cadelas. *Pesq Vet Bras*. 2014; 34(5): 455-61.

Mees ST, Mardin WA, Wendel C, Baeumer N, Willscher E, Senninger N, et al. EP300 - a miRNA-regulated metastasis suppressor gene in ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Int J Cancer*. 2010; 126(1): 114-24.

Menditi KBC, Kang HC. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. *Rev Bras Cancer*. 2007; 53(4): 453-60.

Núcleo de Informações em Saúde. NIS/DAS/SES-RS, 2008.

Oliveira DE. Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe [Tese]. UNESP, Botucatu, 2002.

Pesce M, Scholer H. Oct4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*. 2001; 19(4): 271-8.

Peulen O, Gonzalez A, Peixoto P, Turtoi A, Mottet D, Delvenne P, et al. The anti-tumor effect of HDAC inhibition in a human pancreas cancer model is significantly improved by the simultaneous inhibition of cyclooxygenase 2. *PLoS One*. 2013; 8(9): e75102.

Pinho MSL. Célula tronco tumoral: novo conceito em carcinogênese colorretal. *Rev Bras Coloproctol*. 2009; 29(1): 120-4.

Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CAMJ*. 2006; 174(3): 341-48.

Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005; 41(16): 2381-402.

Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*. 2005; 435(7046): 1262-6.

Tan AC, Jimeno A, Lin SH, Wheelhouse J, Chan F, Solomon A, et al. Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol*. 2009; 3(5-6): 425-38.

Trapasso S, Allegra, E. Role of CD44 as a marker of cancer stem cells in head and neck cancer. *Biologics*. 2012; 6: 379-83.

Tzao C, Tung HJ, Jin JS, Sun GH, Hsu HS, Chen BH, et al. Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mod Pathol*. 2009; 22(2): 252-60.

Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer*. 2004; 112(2): 171-8.

Wang Q, He W, Lu C, Wang Z, Wang J, Giercksky KE, et al. Oct3/4 and Sox2 Are Significantly Associated with an Unfavorable Clinical Outcome in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2009; 29(4): 1233-42.

Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46(4): 351-60.

Yeo CJ, Cameron JL. Prognostic factors in ductal pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383(2): 129-33.

Zorgetto VA, Silveira GG, Oliveira-Costa JP, Soave DF, Soares FA, Ribeiro-Silva A. The relationship between lymphatic vascular density and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) expression with clinical-pathological features and survival in pancreatic adenocarcinomas. *Diagn Pathol*. 2013; 8: 170.

## 7. ARTIGO

### **Cancer Stem Cells Markers Associates with development and aggressive phenotype in Pancreatic Cancer**

**Camila Juliano Salvador Rodrigues<sup>1,2</sup>, Elita Ferreira da Silveira<sup>2</sup>, Rafael da Silveira Vargas<sup>2</sup>, Giordano Gatti De Giacomo<sup>3</sup>, Marino Muxfeldt Bianchin<sup>1</sup>**

1 - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brazil.

2 - Serviço de Patologia, Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Correa Jr. Rio Grande - RS, Brasil

3 - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande - FURG Rio Grande - RS, Brasil

#### **Corresponding author:**

Camila Juliano Salvador Rodrigues, MD  
Serviço de Patologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Rua Ramiro Barcelos 2350. 90035-903 Porto Alegre RS Brazil  
e-mail: camila\_juliano@yahoo.com.br  
Tel.: + 55 53 32311088 Fax: + 55 53 32311088

## ABSTRACT

Cancer stem cells (CSCs), also known as tumor-initiating cells, are suggested to be responsible for drug resistance and cancer development due in part to their ability to self-renew themselves and differentiate into heterogeneous lineages of cancer cells. CSCs may be involved in tumor cell biology, including cell growth, differentiation, tumor progression, and therapeutic resistance. Recently, studies have suggested that CSCs are involved in the carcinogenesis of various tumors, but few studies have been conducted on pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs). Thus, it is important to understand the characteristics and mechanisms by which CSCs display resistance to therapeutic agents and their role in the tumor growth. This study was designed to investigate the role of cancer stem cells (CSCs) in pancreatic cancer. A retrospective clinicopathological analysis was undertaken in 112 patients diagnosed with PDAC between 2005 and 2010, and immunohistochemistry was performed with antibodies against CD133, CD24, and OCT4. Positive nuclear, cytoplasmic or membrane staining for each antibody was rated on staining intensity, being classified into low/moderate or strong staining groups. Results were analyzed relative to each patient's clinicopathologic parameters. There was a established relationship between the staining of the markers with some variables associated with worse prognosis, being the three markers present in most tumor cells and associated with tumor progression. We suppose that Cancer stem cells are present from the beginning of tumor initiation and are intrinsically related to tumor development. Although the presence of stem cells has been associated with molecular biology of various tumors, their expression in pancreatic cancer has not yet been clinically reported. The presence of stem cells and their role in pancreatic cancer tumorigenesis may be considered as valuable prognostic factors, although the mechanism involved needs further investigation. Increasing insights into role of cancer stem cells and carcinogenesis can ultimately generate new ideas for molecularly based diagnostic and therapeutic approaches.

**Keywords:** Cancer stem cells. Pancreatic cancer. CD133. CD24. OCT4.

## INTRODUCTION

Despite progress in cancer diagnosis and treatment over the past decades, it remains one of the most common causes of death worldwide. While potentially curable when diagnosed early, early diagnosis remains a challenge in daily clinical practice. Many cancers are diagnosed at a late stage, when therapeutic options are no longer effective<sup>(1)</sup>.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a highly aggressive disease usually diagnosed in an advanced stage and for which few effective therapies are available. It is a neoplasm whose incidence is almost equal to its mortality. The reason why pancreatic cancer has such a poor prognosis and why it has such a low therapeutic response to chemotherapy and radiotherapy are questions that have motivated the search for an answer that can modify the course of this disease. Despite advances in surgical techniques, which today are considered the only curative option, the average 5-year survival rate is less than 5% (1-3%)<sup>(1-2)</sup>. It is considered the neoplasia with the worst prognosis out of more than 60 types of cancers, a fact evidenced by its incidence rate almost equaling the mortality rate<sup>†(3)</sup>. It should be noted that early cancer detection, at a stage that can still be cured, is associated with greater therapeutic effectiveness and is currently one of the ways to improve the outcome of patients diagnosed with pancreatic cancer<sup>(4)</sup>.

The molecular biology of pancreatic cancer is directly related to its rapid progression and low therapeutic response. It is well-documented that the appearance of a tumor cell is the result of an accumulation of mutations in its DNA capable of morphologically and functionally altering its normal properties<sup>(5-6)</sup>. The triggering of this process and its molecular evolution, culminating in the formation of the tumor cell and its pertinent characteristics, characterize the process of carcinogenesis. It is well-understood in the literature that the development of a neoplasia involves a set of molecular changes that lead not only to the emergence and survival of a tumor cell, but to its ability to invade adjacent tissues and form distant metastases<sup>(7)</sup>.

Among the processes most recently implicated in carcinogenesis and tumor progression, changes in cancer stem cells (CSCs) are still poorly studied in pancreatic cancer with no satisfactory results, and they are deserving of greater

---

<sup>†</sup> Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med.* 1992; 326: 455-65.

efforts in elucidating their effects and relationship in acquiring a pancreatic malignant phenotype. Recent evidence has suggested that CSCs play a crucial role not only in the generation and maintenance of different tissues, but also in the development, progression, and therapeutic resistance of different tumor types<sup>(8)</sup>.

CSCs belong to a differentiated group of cells within a tumor with self-renewing and differentiating properties, similar to normal stem cells, giving rise to heterogeneous tumor cell lines that form one tumor. They can divide and originate several cells that make up tumors, thus perpetuating their growth and offering resistance to chemotherapy by mechanisms not yet well-understood. Because of this, they represent an important research target<sup>(9)</sup>.

The intrinsic aggressiveness of pancreatic cancer, with its high capacity for local invasion, high metastatic potential, late diagnosis, and therapeutic resistance, seems to be partly related to the population of CSCs that make up these tumors<sup>(10)</sup>. Furthermore, it has been shown that PDAC contains not only a homogeneous population of CSCs, but diverse subpopulations that may be involved in tumor progression. Until now, identified pancreatic CSCs constitute a minority of tumor component cells (about 1-5%), and have a high capacity for self-renewal<sup>(11)</sup>. The most important clinical aspect, however, is that these CSCs are highly resistant to chemotherapy and radiotherapy, resulting in resistance and rapid recurrence of the disease. Currently, one of the great challenges of oncology is identifying and studying the characteristics of these CSCs, especially in PDAC, in which few discoveries have been made<sup>(12)</sup>.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Case Selection and Tumor Samples**

The tissue samples were from a cohort of 112 consecutive pancreatic cancers diagnosed from 2005 to 2010, selected from the routine care of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), by the Department of Pathology and Group of Biliary Tract and Pancreas. Immunohistochemical analyses were performed in paraffin-embedded tissue blocks already stored in the Department of Pathology of HCPA, after approval by the Scientific Committee and the Committee on Ethics in Health Research of the institution. The following variables were recorded from medical records: age, sex,

tumor grade, lymph node status, occurrence of metastasis, treatment received (type of surgery, radiation therapy, and chemotherapy), disease free-survival, and overall survival.

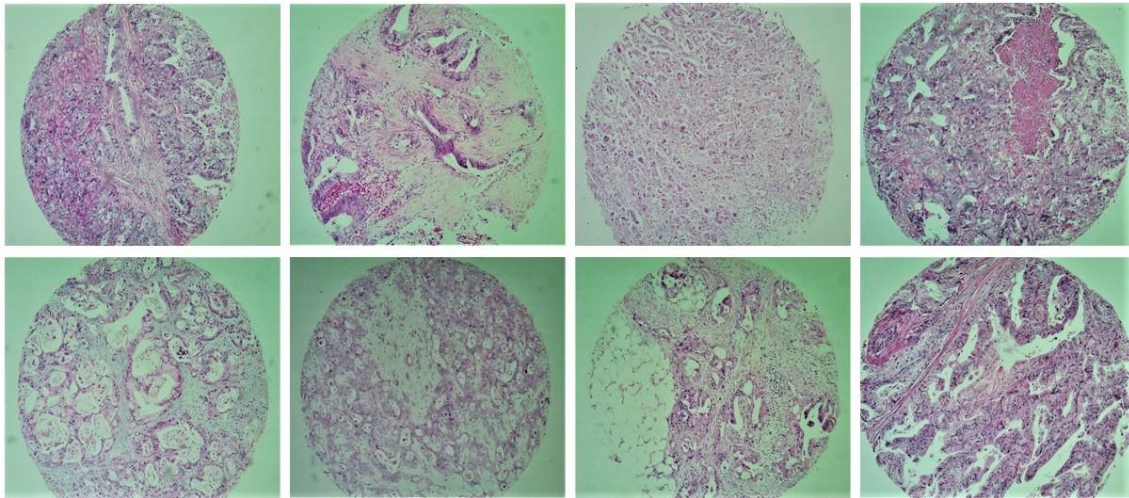
### **Tissue Microarray (TMA) immunohistochemical analysis**

Tissue Microarray (TMA) array is a technique first described by Kononen et al.(13) and is a great tool for investigative pathology. It is about grouping in a single block a reasonable number of tissue samples, thus allowing the study of immunohistochemical expression of molecular markers, with great use of the material, presence of internal control, and time and cost effective. This technique also allows the standardization of reactions, efficient representativeness through the use of different areas of the tumor, study of large numbers of samples simultaneously, ease of interpretation and large-scale research of prognostic or predictive factors of cancer.

Firstly, the donor blocks are selected, which should have a good material quality, as well as good representativeness, which is defined from the analysis of the archived HE blade. Then, the relevant area for the making of the TMA block is selected to evaluate the exact representation of the tissue / neoplasia in the donor block, then marking the area to be studied by the TMA. Using 0.8 mm needles, the chosen area is punctured and cylinders are inserted into a paraffin block, arranging them in a standardized way. The maps of the chosen matrix are established with the marks of the equipment and with distances between the cylinders. Conventional microtome histological sections are then made from this receptor block and the slides are made.



Figure 1 - exemplifies some tumor tissue samples included in the study by the TMA technique



### **Immunohistochemistry for Stem Cell Markers**

Initially, pilot tests were conducted to determine the antibody dilutions and the patterns of positive control slides as indicated by the manufacturer, subject to the conditions of the laboratory (positive control) and without the primary antibody (negative control). Four micrometer thick sections were placed on electrically charged plates and incubated at 60°C overnight. The sections were identified and dewaxed in xylol, then passed into ethyl alcohol in decreasing concentrations (100%, 85%, and 75%), and washed in running water for 5 minutes. Antigen retrieval was performed following the recommendations provided by the manufacturer (Abcam, Cambridge, UK). After antigen retrieval, endogenous peroxidase was blocked and the sections were incubated in blocking protein (Abcam) for 5 minutes at room temperature in a humid chamber. The sections were incubated with primary antibodies (CD133, CD24, OCT4) for 90 minutes at room temperature and subsequently incubated with a secondary antibody for 30 minutes at room temperature. After washing in PBS, the sections were incubated with chromogen for 5 minutes, washed in running water, and counter-stained with hematoxylin. Then, the slides were washed in running water, dehydrated, and mounted with balsam and coverslips for microscopic analysis.

## Statistical analysis

To verify the association between immunohistochemical variables and immunoreaction intensity with the characterization variables of individuals, a non-parametric approach was used with Fisher's exact test. To verify the association of the numerical variable age with immunohistochemical variables and intensity, the Mann-Whitney U test was used.

The association between stem cell markers and different clinicopathological characteristics of patients [including age, sex, tumor differentiation, stage, Tumor-Node-Metastasis (TNM) category, and tumor resection] was evaluated by Pearson's correlation coefficient or  $\chi^2$  tests as appropriate. For intensity, the categories were dichotomized into low/moderate intensity (0-2+) or high intensity ( $\geq 3+$ ).

The Kaplan-Meier method was used for estimating the probability of survival. Survival curves were compared using the log-rank test, which asserts under the null hypothesis that survival functions do not differ from each other.

Overall survival time was measured from the time of surgery or biopsy to either the date of death (as a result of any cause) or to the last follow-up. Disease-free survival time was measured from the date of histological diagnosis or surgery to the date of the first disease-free failure event (defined as locoregional relapse), distant disease, or death as a result of any cause.

Significance was established at  $P < 0.05$ .

All statistical analyses were performed using R (version 3.6.0).

## RESULTS

Immunohistochemical analyses indicated the presence of tumor stem cell surface markers for the three antibodies analyzed in PDAC cells. A total of 112 patients with pancreatic cancer were included in this study: 59 (52.6%) males and 53 (47.4%) females, with a median age at diagnosis of 63 years (range, 36-93 years, SD  $\pm 10.3$ ) and a median post-diagnosis follow-up period of 16.2 months.

There was no significant difference between sexes when comparing antibody signal intensity. Fifty patients (48.08%) died during the follow-up period.

Among all patients included, 16 (15.2%) were in pathologic stage I, 32 (30.4%) were in pathologic stage II, 25 (23.8%) were in pathologic stage III, and 32 (30.4%) were in pathologic stage IV. In cases where information on tumor grade was available, 2.8% of carcinomas were well-differentiated, 62.8% were moderately differentiated, and 34.2% were poorly differentiated.

Regarding the TNM stage, 11.2% were T1 (tumor smaller than 2 cm), 38.3% were T2 (tumor larger than 2 cm or invading neighboring tissues), 19.6% were T3 (tumor of any size invading nearby tissues, but without compromising the celiac plexus or superior mesenteric artery), 21.5% were T4 (tumor of any size compromising vital organs and celiac plexus or superior mesenteric artery), and 9.3% were Tx (extent of the tumor is unknown). For lymph node involvement, 31.7% were in stage N0 (no lymph node metastasis), 31.7% were N1 (regional lymph node metastasis), 6.5% were N2 (more than one affected lymph node chain), and 29.9% were Nx (not evaluable). Regarding the presence of metastasis, 66.6% were in stage M0 (no distant metastases), 30.2% were M1 (distant metastasis), and 3.6% were Mx (not evaluable).

About 75.9% of samples were obtained from pancreatic tumor tissue, and about 26% were from metastasis samples, with the liver (65.7%) being the most affected site, followed by the lymph nodes (14.2%), peritoneum (8.5%), and others (11.4%).

Palliative treatment was given to 68 individuals, or 76.40% of the total number of people analyzed.

Regarding the location of the tumor, 81.6% of tumors were located in the head of the pancreas, 22.9% in the body, and 6.4% in the tail.

Age was categorized into 2 other variables, one with 2 categories and one with 3. This categorization was performed in order to distribute individuals relatively evenly across categories.

Table 1 summarizes the general descriptive analysis of the individuals involved in the study.

Table 1 - General Descriptive Analysis

<b>Variables</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Sex</b>		
Female	53	47,4
Male	59	52,6
<b>Age - 2 categories</b>		
[35,65)	60	55,1
[66,93)	49	44,9
<b>Age - 3 categories</b>		
[35,59)	37	33,9
[60,69)	39	35,8
[70,93)	33	30,3
<b>Death (n=104)</b>		
No	54	51,9
Yes	50	48,1
<b>Tratamiento cirúrgico (n=108)</b>		
Palliative	42	38,9
Partial surgery	19	17,6
DPT**	47	43,5
<b>Surgical treatment (n=89)</b>		
No	21	23,6
Yes	68	76,4
<b>Tumor differentiation (n = 105)</b>		
Well differentiated	3	2,9
Moderate differentiated	66	62,8
Poor differentiated	36	34,3
<b>Especimen/Sample (n=108)</b>		
Metastasis	26	24,1
Pancreas	82	75,9
<b>Tumor pathologic stage T (n=107)</b>		
T1	12	11,2
T2	41	38,3
T3	21	19,6
T4	23	21,5
TX	10	9,4
<b>Tumor pathologic stage N (n= 107)</b>		
N0	34	31,8
N1	34	31,8
N2	7	6,5
NX	32	29,9
<b>Tumor pathologic stage M (n = 109)</b>		
M0	72	66,1
M1	33	30,2
MX	4	3,7
<b>Tumor pathologic general stage (n=105)</b>		
1	16	15,2
2	32	30,5
3	25	23,8
4	32	30,5
<b>MTX (n=35)</b>		
Liver	23	65,7
Lymph Nodes	5	14,3

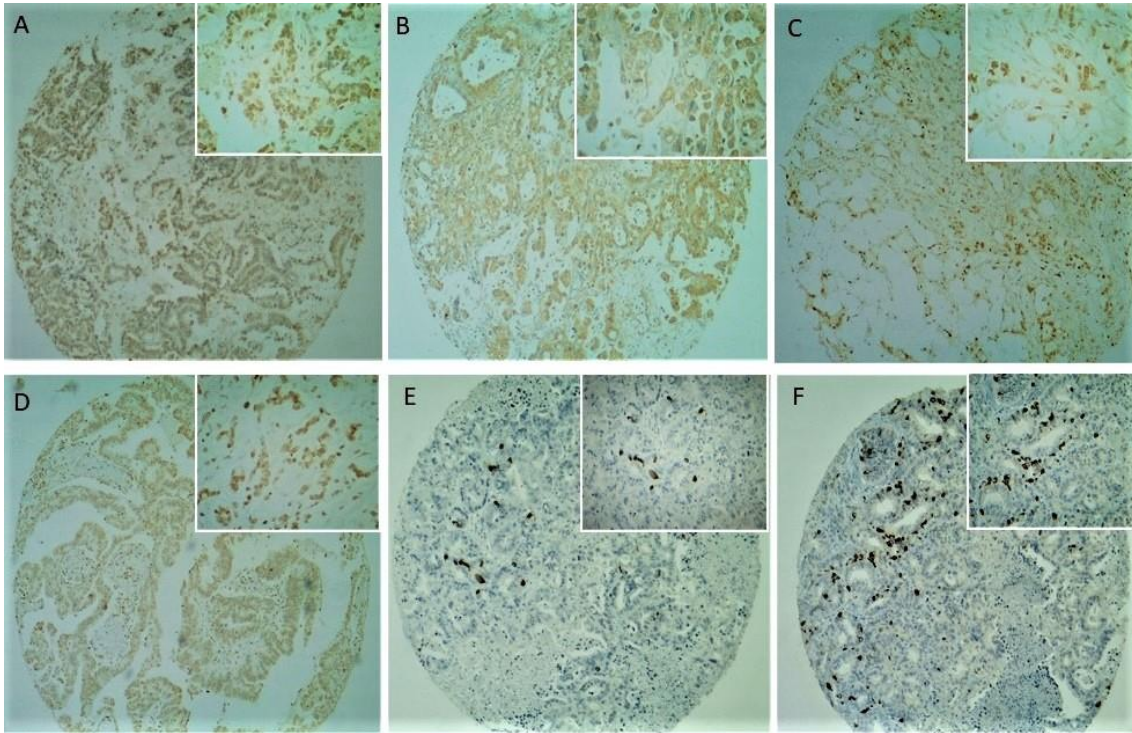
Peritoneum	3	8,6
Others	4	11,4
<b>Location: Tumor Head</b>		
Yes	89	81,7
<b>Location: Tumor Tail</b>		
Sim	7	6,4
<b>Location: Tumor Body</b>		
Sim	25	22,9
<b>Total</b>	<b>112</b>	<b>100,0</b>

\*\*Pancreatectomy Duodenum (DPT)

### **CD133 Immunostaining in Cancer Stem Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells**

CD133 immunostaining was present in the plasma membrane and cytoplasm at moderate to strong intensity (Figures 1C and 1D), with a predominantly strong intensity. A positive or negative reaction was confirmed with the positive control (placenta) used in the study. Positive CD133 staining was seen in 84.4% of males, and the Fisher's exact test p-value ( $p = 1,0$ ) concludes that there is no association between sex and CD133 signal.

No CD133 immunoreactivity was observed in normal pancreatic ductal epithelium.



**Figure 1.** Immunohistochemical analysis of Cancer stem cells markers in TMA pancreatic cancer samples. **(1A,1B)** CD24 expression was observed mainly in the cytoplasm of tumour cells. **(1C,1D)** CD133 expression was observed mainly in the membrane and cytoplasm of tumour cells, rarely nuclear. **(1E,1F)** OCT4 expression was observed in the nucleo of tumour cells, with a focal expression and strong intensity. Lowest magnifying field (40x) are represented in the global panel and highest magnifying field (100x) in the reduced panel.

Regarding surgical treatment, 95.1% of patients undergoing treatment 1 (bileodigestive shunt) were CD133-positive, 70.0% of patients undergoing treatment 2 (partial surgery) were CD133-positive, and 81.2% of patients undergoing treatment 3 (total duodenopancreatectomy) were CD133-positive. There was a significant association ( $p = 0,019$ ) between surgical treatment and CD133 signal. In addition to surgical treatment, only the sample type was significantly associated with CD133 signal, at a 5% significance level.

The degree of tumor differentiation (good, moderate, or poor) showed no significant association with positive CD133 immunostaining, although it was observed that as the tumor grade progressed, the staining intensity increased (83.7% in poorly differentiated tumors). There was also no significant association between TNM staging and positive CD133 immunostaining, but in later stages the labeling intensifies, even though the presence of CSCs from the earliest stages is observed

here. This corroborates the hypothesis that the CSCs have been present since the beginning of the carcinogenesis process.

Table 2 shows the descriptive analysis of the variables together with the verification of their association with CD133 immunoreactivity, given by Fisher's exact test.

**Table 2 - Association of variables with positive CD133**

	IHC CD133 positive				p-Value*
	No		Yes		
	N	%	N	%	
<b>Sex</b>					1,000
Female	8	15,1	45	84,9	
Male	9	15,5	49	84,5	
<b>Age - 2 categories</b>					0,598
[35,65)	8	13,1	53	86,9	
[66,93)	9	18,0	41	82,0	
<b>Age - 3 categories</b>					1,000
[35,59)	6	16,2	31	83,8	
[60,69)	6	15,0	34	85,0	
[70,93)	5	14,7	29	85,3	
<b>Death (n=106)</b>					0,192
No	6	11,1	48	88,9	
Yes	11	21,1	41	78,9	
<b>Surgical Treatment (n=109)</b>					<b>0,019</b>
Palliative	2	4,9	39	95,1	
Partial Surgery	6	30,0	14	70,0	
DPT**	9	18,7	39	81,3	
<b>Palliative Treatment (n= 91)</b>					0,474
No	4	18,2	18	81,8	
Yes	8	11,6	61	88,4	
<b>Degree of Differentiation (n=107)</b>					0,084
Well differentiated	2	66,7	1	33,3	
Moderate differentiated	9	13,4	58	86,6	
Poor differentiated	6	16,2	31	83,8	
<b>Especimem/sample (n=107)</b>					<b>0,028</b>
Metastasis	7	29,2	17	70,9	
Pancreas	9	10,9	74	89,2	
<b>Stage T (n=109)</b>					0,587
T1	3	25,0	9	75,0	
T2	5	12,5	35	87,5	
T3	4	19,0	17	81,0	
T4	2	8,0	23	92,0	
TX	2	18,2	9	81,8	
<b>Stage N (n=109)</b>					0,830
N0	4	11,4	31	88,6	



N1	6	17,6	28	82,4	
N2	1	16,7	5	83,3	
NX	5	14,7	29	85,3	
<b>Stage M (n=106)</b>					0,132
M0	8	11,3	63	88,7	
M1	9	25,7	26	74,3	
MX	0	-	5	100,0	
<b>General stage (n=107)</b>					0,133
1	2	12,5	14	87,5	
2	5	15,6	27	84,4	
3	1	4,0	24	96,0	
4	9	26,5	25	73,5	
<b>MTX (n=34)</b>					0,645
Liver	7	30,4	16	69,6	
Lymph Nodes	3	60,0	2	40,0	
Peritoneum	1	25,0	3	75,0	
Others	1	20,0	4	80,0	
<b>Location: Tumor Head</b>					0,186
Yes	12	13,2	79	86,8	
<b>Location: Tumor Tail</b>					0,071
Yes	3	42,9	4	57,1	
<b>Location: Tumor Body</b>					1,000
Yes	4	16,0	21	84,0	

\*Teste Exato de Fisher

\*\*Duodenopancreatectomia (DPT)

Tables 3 and 4 show the p-values and associations of variables with intensity when CD133 staining was positive. By Fisher's exact test ( $p = 0,036$ ), only stage M showed a significant association with intensity of CD133; that is, tumors that have already metastasized are strongly stained for CD133.



Table 3 - P-values of association with intensity

Variables	Groups	Valor-p <sup>1</sup>		
		IHC CD133 - Intensity when positive	IHC CD24 - Intensity when positive	IHC OCT4 - Intensity when positive
Sex	Female Male	0,222	0,438	0,619
Death	No Yes	1,000	0,235	0,627
Surgical Treatment	Palliative Cir. Partial DPT	0,815	0,732	0,620
Palliative Treatment	No Yes	0,136	<b>0,027</b>	0,619
Degree of differentiation	Well differentiated Moderate differentiated Poor differentiated	0,266	0,442	0,407
Especimem/sample	Metastasis Pancreas	0,848	0,201	0,488
Stage T	T1 T2 T3 T4 TX	0,611	0,992	1,000
Stage N	N0 N1 N2 NX	0,560	0,920	0,180
Stage M	M0 M1 MX	<b>0,036</b>	0,350	0,078
General stage	1 2 3 4	0,337	0,380	0,218
MTX	Liver Peritoneum Lymph Nodes Others	0,094	<b>0,037</b>	1,000
Location: Tumor Head	No	0,779	0,314	1,000

	Yes			
Location: Tumor Tail	No			
	Yes	0,337	0,125	1,000
Location: Tumor Body	No			
	Yes	0,459	0,359	1,000
Age - 2 categories	[35,65)			
	[65,93)	1,000	1,000	0,104
Age - 3 categories	[35,59)			
	[60,69)	0,841	0,406	0,096
	[70,93)			

\* Fisher Exact Test

Table 4 Association of intensity with variables

Variable	IHC CD133 positive (n=94)				IHC CD24 positive (n=108)				IHC OCT4 positive (n=35)			
	Faint/Moderate		Strong		Faint/Moderate		Strong		Faint/Moderate		Strong	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Sex</b>	* p = 0,222				* p = 0,438				* p = 0,619			
Female	18	40,0	27	60,0	23	46,0	27	54,0	1	6,7	14	93,3
Male	26	53,1	23	46,9	22	37,9	36	62,1	3	15,0	17	85,0
<b>Age - 2 categories</b>	* p = 1,000				1,000				* p = 0,104			
[35,65)	25	47,2	28	52,8	24	41,4	34	58,6	4	22,2	14	77,8
[66,93)	19	46,3	22	53,7	21	42,0	29	58,0	0	-	17	100,0
<b>Age - 3 categories</b>	* p = 0,841				* p = 0,406				* p = 0,096			
[35,59)	16	51,6	15	48,4	13	38,2	21	61,8	1	9,1	10	90,9
[60,69)	15	44,1	19	55,9	20	50,0	20	50,0	3	27,3	8	72,7
[70,93)	13	44,8	16	55,2	12	35,3	22	64,7	0	-	13	100,0
<b>Death</b>	* p = 1,000				* p = 0,235				* p = 0,627			
No	22	45,8	26	54,2	19	36,5	33	63,5	3	15,0	17	85,0
Yes	19	46,3	22	53,7	25	49,0	26	51,0	1	7,1	13	92,9
<b>Surgical Treatment</b>	* p = 0,815				* p = 0,732				* p = 0,620			
Palliative	20	51,3	19	48,7	18	46,1	21	53,9	2	11,1	16	88,9
Partial Surgery	7	50,0	7	50,0	7	35,0	13	65,0	1	20,0	4	80,0
DPT**	17	43,6	22	56,4	19	40,4	28	59,6	1	8,3	11	91,7
<b>Palliative Treatment</b>	* p = 0,793				* p = 0,197				* p = 1,000			
No	8	44,4	10	55,6	6	31,6	13	68,4	1	10,0	9	90,0
Yes	25	41,0	36	59,0	34	50,0	34	50,0	3	15,0	17	85,0
<b>Degree of Differentiation</b>	* p = 0,266				0,442				* p = 0,407			
Well differentiated	0	-	1	100,0	0	-	3	100,0	0	-	2	100,0
Moderate differentiated	24	41,4	34	58,6	28	43,1	37	56,9	2	8,0	23	92,0
Poor differentiated	17	54,8	14	45,2	14	38,9	22	61,1	2	25,0	6	75,0
<b>Especimen/sample</b>	* p = 0,848				* p = 0,201				* p = 0,488			
Metastasis	7	36,4	9	63,6	7	22,2	16	77,8	1	25,0	3	75,0
Pancreas	36	48,6	38	51,4	37	45,1	45	54,9	3	10,3	26	89,7
<b>Stage T</b>	* p = 0,611				* p = 0,992				* p = 1,000			
T1	2	22,2	7	77,8	5	41,7	7	58,3	0	-	4	100,0
T2	18	51,4	17	48,6	17	42,5	23	57,5	3	17,6	14	82,4
T3	9	52,9	8	47,1	9	45,0	11	55,0	0	-	5	100,0
T4	11	47,8	12	52,2	9	37,5	15	62,5	1	14,3	6	85,7

TX	4	44,4	5	55,6	4	40,0	6	60,0	0	-	2	100,0
<b>Stage N</b>		* p = 0,560				* p = 0,920				* p = 0,180		
N0	12	38,7	19	61,3	15	44,1	19	55,9	1	7,1	13	92,9
N1	16	57,1	12	42,9	14	43,7	18	56,3	0	-	10	100,0
N2	2	40,0	3	60,0	3	42,9	4	57,1	1	25,0	3	75,0
NX	14	48,3	15	51,7	12	36,4	21	63,6	2	28,6	5	71,4
<b>Stage M</b>		* p = 0,036				* p = 0,350				* p = 0,078		
M0	29	46,0	34	54,0	32	46,4	37	53,6	1	4,0	24	96,00
M1	10	38,5	16	61,5	12	35,3	22	64,7	2	28,6	5	71,4
MX	5	100,0	0	-	1	20,0	4	80,0	1	33,3	2	66,7
<b>Generale Stage</b>		* p = 0,337				* p = 0,380				* p = 0,218		
1	5	35,7	9	64,3	9	60,0	6	40,0	0	-	5	100,0
2	16	59,3	11	40,7	14	45,2	17	54,8	0	-	10	100,0
3	11	45,8	13	54,2	10	40,0	15	60,0	1	10,0	9	90,0
4	9	36,0	16	64,0	11	33,3	22	66,7	2	28,6	5	71,4
<b>MTX</b>		* p = 0,094				* p = 0,037				* p = 1,000		
Liver	8	50,0	8	50,0	6	27,3	16	72,7	1	25,0	3	75,0
Lymph Nodes	0	-	2	100,00	4	80,0	1	20,0	0	-	0	-
Peritoneum	0	-	3	100,00	0	-	4	100,0	0	-	1	100,0
Others	0	-	4	100,00	3	60,0	2	40,0	1	50,0	1	50,0
<b>Location: Tumor Head</b>		* p = 0,779				* p = 0,314				* p = 1,000		
Yes	36	45,6	43	54,4	35	39,3	54	60,7	4	12,9	27	87,1
<b>Location: Tumor Tail</b>		* p = 0,337				* p = 0,125				* p = 1,000		
Yes	3	75,0	1	25,0	5	71,4	2	28,6	0	-	2	100,00
<b>Location: Tumor Body</b>		* p = 0,459				* p = 0,359				* p = 1,000		
Yes	8	38,1	13	61,9	12	50,0	12	50,0	0	-	6	100,0

\*Teste Exato de Fisher

\*\*Duodenopancreatectomia (DPT)

The average age of those in which CD133 staining was negative was 60.82 years, and 63.09 years in the positive-staining group. However, there was no significant difference between groups with respect to age according to the Mann-Whitney U test ( $p = 0,598$ ). Age remains an independent risk factor for tumor development, unrelated to CSC marker staining. The intensity analysis also indicates no age difference between the low/moderate and strong intensity groups.

### **CD24 Immunostaining in Cancer Stem Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells**

CD24 immunostaining (Figures 1A and 1B) was present in the plasma membrane and cytoplasm at both weak/moderate (41.6%) and strong (58.3%) intensities, but at a weaker intensity when compared to CD133 (Figures 1C and 1D). The positive and negative reactions were confirmed with the positive control (placenta) used in the study. Table 5 shows the descriptive analysis of the variables together with the verification of their association with CD24 positivity, given by Fisher's exact test. A positive CD24 signal was seen in 98.3% of males, but there was no association between sex and CD24 positivity ( $p = 0,343$ ). Only the type of sample collected and palliative treatment were significantly associated with CD24 signal, at a 5% significance level ( $p = 0,010$  and  $0,042$  respectively).

Table 5 - Association of variables with positive CD24

	IHC CD24 positive				value -p*
	No		Yes		
	N	%	N	%	
<b>Sex</b>					0,343
Female	3	5,7	50	94,3	
Male	1	1,7	58	98,3	
<b>Age - 2 categories</b>					0,624
[35,65)	3	4,9	58	95,1	
[66,93)	1	2,0	50	98,0	
<b>Age - 3 categories</b>					0,159
[35,59)	3	8,1	34	91,9	
[60,69)	0	-	40	100,0	
[70,93)	1	2,9	34	97,1	
<b>Death (n=107)</b>					0,618
No	3	5,4	52	94,6	
Yes	1	1,9	51	98,1	

<b>Surgical Treatment (n=110)</b>					0,399
Palliative	3	7,1	39	92,9	
Partial Surgery	0	-	20	100,0	
DPT**	1	2,1	47	97,9	
<b>Palliative Treatment (n=91)</b>					<b>0,042</b>
No	3	13,6	19	86,4	
Yes	1	1,4	68	98,6	
<b>Degree of Differentiation (n=108)</b>					1,000
Well differentiated	0	-	3	100,0	
Moderate differentiated	3	4,4	65	95,6	
Poor differentiated	1	2,7	36	97,3	
<b>Especimem/sample (n=108)</b>					<b>0,010</b>
Metastasis	1	4,0	23	95,9	
Pancreas	2	2,4	82	97,6	
<b>Stage T (n=110)</b>					0,705
T1	0	-	12	100,0	
T2	1	2,4	40	97,6	
T3	1	4,8	20	95,2	
T4	1	4,0	24	96,0	
TX	1	9,1	10	90,9	
<b>Stage N (n=110)</b>					0,881
N0	1	2,9	34	97,1	
N1	2	5,9	32	94,1	
N2	0	-	7	100,0	
NX	1	2,9	33	97,1	
<b>Stage M</b>					1,000
M0	3	4,2	69	95,8	
M1	1	2,9	34	97,1	
MX	0	-	5	100,0	
<b>General Stage (n=108)</b>					0,913
1	1	6,2	15	93,8	
2	1	3,1	31	96,9	
3	1	3,8	25	96,2	
4	1	2,9	33	97,1	
<b>MTX (n=37)</b>					1,000
Liver	1	4,3	22	95,7	
Lymph Nodes	0	-	5	100,0	
Peritoneum	0	-	4	100,0	
Others	0	-	5	100,0	
<b>Location: Tumor Head</b>					0,550
Yes	3	3,3	89	96,7	
<b>Location: Tumor Tail</b>					1,000
Yes	0	-	7	100,0	
<b>Location: Tumor Body</b>					1,000
Yes	1	4,0	24	96,0	

\*Teste Exato de Fisher

\*\*Duodenopancreatctomia (DPT)

No CD24 immunoreactivity was observed in normal pancreatic ductal epithelium.

A positive CD24 signal was seen in 98.6% of patients undergoing palliative treatment, which was significant ( $p = 0,042$ ). Due to their advanced tumor staging, they had a stronger CD24 signal compared to individuals who underwent total duodenopancreatectomy. The CD24 signal was stronger in individuals who underwent palliative treatment as a treatment option (98.6%) when compared to those who did not (13.6%).

The degree of tumor differentiation and staging showed no significant association with CD24-positive staining, nor were there significant differences between poorly differentiated or advanced-stage tumors compared to well-differentiated and early-stage tumors with respect to positive CD24.

The tumor location (head, body, or tail of pancreas) showed no significant association. All three variables exhibited diffuse staining for CD24.

The mean age of the CD24-negative group was 55 years, and 63.1 years in the CD24-positive group. However, there was no significant difference between the groups regarding age by the Mann-Whitney U test ( $p = 0,624$ ). The intensity analysis also indicated no significant difference in age between the weak/moderate and strong groups.

Tables 3 and 4 show the association of variables with intensity when CD24 was positive. Only the presence of metastasis (MTX) was significantly associated with intensity, where the liver and peritoneum showed a strong positivity when compared to metastasis in other sites, such as lymph nodes and other tissues.

### **OCT4 Immunostaining in Cancer Stem Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells**

OCT4 immunostaining showed a different pattern in relation to the other antibodies tested. The frequency of positive cases was not as high as observed with the other two antibodies tested, but when positive, its intensity was very strong (Figures 1E and 1F). Immunostaining occurred in the tumor cell nucleus in 31.5% of the cases and did not stain 68.7% of the tumors analyzed. No OCT4 immunoreactivity was observed in normal pancreatic ductal epithelium.

Table 6 shows the descriptive analysis of the variables together with the verification of their association with OCT4 signal. Only 33.9% of males had positive

OCT4 staining, with no association between sex and OCT4 staining. No variable was significantly associated with OCT4 signal, at 5% significance level. The mean age of the OCT4-positive group was 62.62 years, and 63.23 years in the OCT4-negative group. However, there was no significant difference between the groups regarding age ( $p = 0,547$ ).

Table 6 - Association of variables with positive OCT4

Variáveis	IHC OCT4 positivo				Valor-p*
	Não		Sim		
	N	%	N	%	
<b>Sex</b>					0,547
Female	38	71,7	15	28,3	
Male	39	66,1	20	33,9	
<b>Age - 2 categories</b>					0,687
[35,65)	43	70,5	18	29,5	
[66,93)	34	66,7	17	33,3	
<b>Age - 3 categories</b>					0,666
[35,59)	26	70,3	11	29,7	
[60,69)	29	72,5	11	27,5	
[70,93)	22	62,9	13	37,1	
<b>Death (n=107)</b>					0,309
No	35	63,6	20	36,4	
Yes	38	73,1	14	26,9	
<b>Surgical Treatment (n=110)</b>					0,170
Palliative	24	57,1	18	42,9	
Partial Surgery	15	75,0	5	25,0	
DPT**	36	75,0	12	25,0	
<b>Palliative Treatment (n=91)</b>					0,194
No	12	54,6	10	45,4	
Yes	49	71,0	20	29,0	
<b>Degree of Differentiation (n=108)</b>					0,106
Well differentiated	1	33,3	2	66,7	
Moderate differentiated	43	63,2	25	36,8	
Poor differentiated	29	78,4	8	21,6	
<b>Especimem/sample (n=108)</b>					0,449
Metastasis	20	83,3	4	16,7	
Pancreas	55	65,5	29	34,5	
<b>Stage T (n=110)</b>					0,524
T1	8	66,7	4	33,3	
T2	24	58,5	17	41,5	
T3	16	76,2	5	23,8	
T4	18	72,0	7	28,0	
TX	9	81,8	2	18,2	
<b>Stage N (n=76)</b>					0,150
N0	21	60,0	14	40,0	
N1	24	70,6	10	29,4	
N2	3	42,9	4	57,1	
<b>NX (n=74)</b>					0,107
M0	27	79,4	7	20,6	



M1	28	80,0	7	20,0	
MX	2	40,0	3	60,0	
<b>General Stage (n=108)</b>					0,490
1	11	68,8	5	31,2	
2	22	68,8	10	31,2	
3	16	61,5	10	38,5	
4	27	79,4	7	20,6	
<b>MTX (n=37)</b>					0,478
Liver	19	82,6	4	17,4	
Lymph Nodes	5	100,0	0	-	
Peritoneum	3	75,0	1	25,0	
Others	3	60,0	2	40,0	
<b>Location: Tumor Head</b>					0,294
Yes	61	66,3	31	33,7	
<b>Location: Tumor Tail</b>					1,000
Yes	5	71,4	2	28,6	
<b>Location: Tumor Body</b>					0,467
Yes	19	76,0	6	24,0	

\*Teste Exato de Fisher

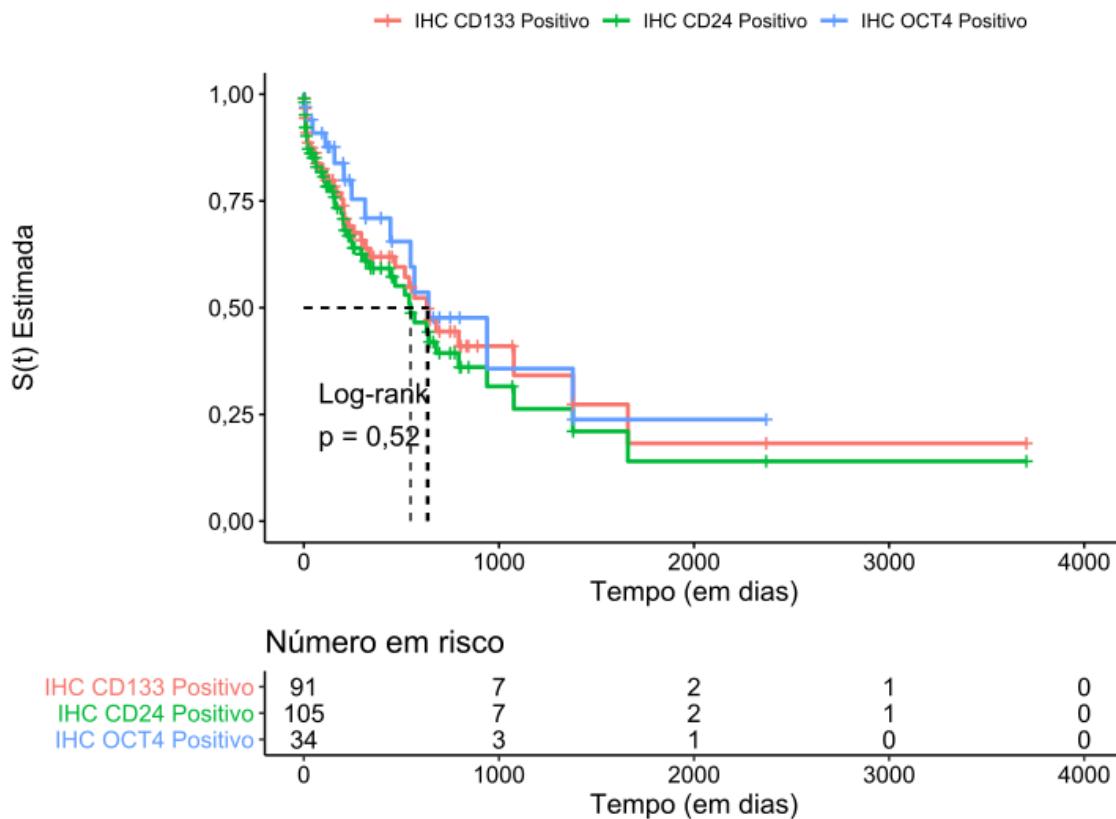
\*\*Duodenopancreatectomia (DPT)

Although not statistically significant, an interesting finding from the OCT4 staining analysis is that the more differentiated the tumor, the greater the staining intensity, while poorly differentiated tumors had low staining intensity (66.6% vs 21.6%). Cells positive for OCT4 have greater potential for differentiation.

## Survival Analysis

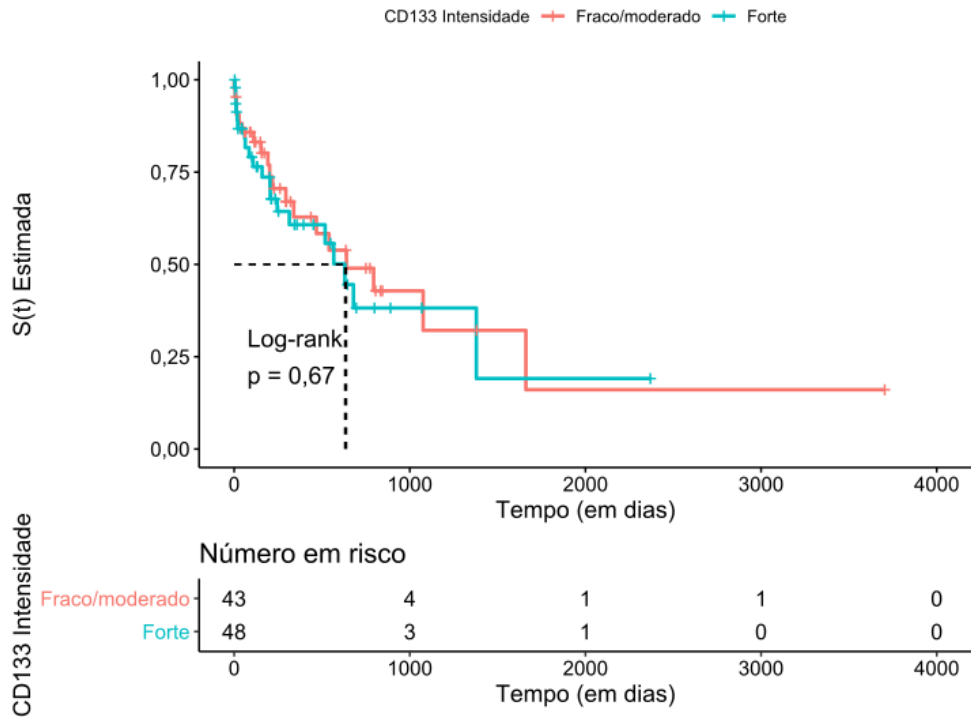
Graph 1 shows the survival curves in relation to the three markers and their respective positive signals. All groups presented very similar curves, so that the log-rank test does not indicate any significant difference between the curves regarding positive signals from the three antibodies.

Graph 1: Kaplan-Meier curves regarding positivities

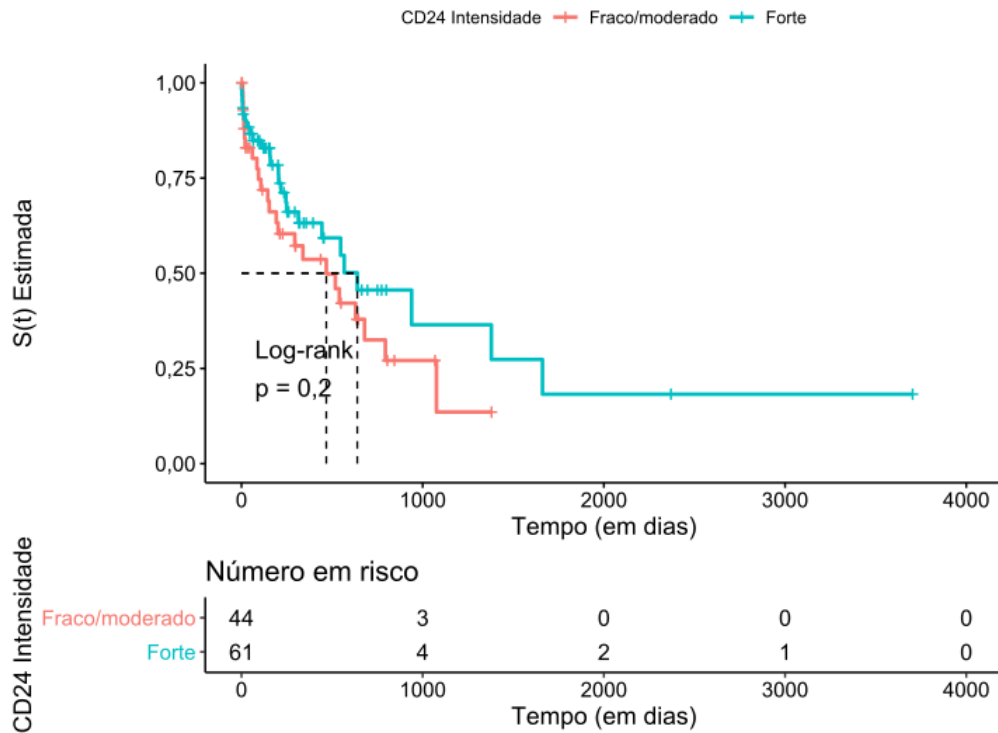


From the Kaplan-Meier curves for CD133, CD24, and OCT4 intensity, confirmed by the log-rank test p-values, none of the survival curves differ significantly with respect to intensity, as the graphs 2,3 and 4 below:

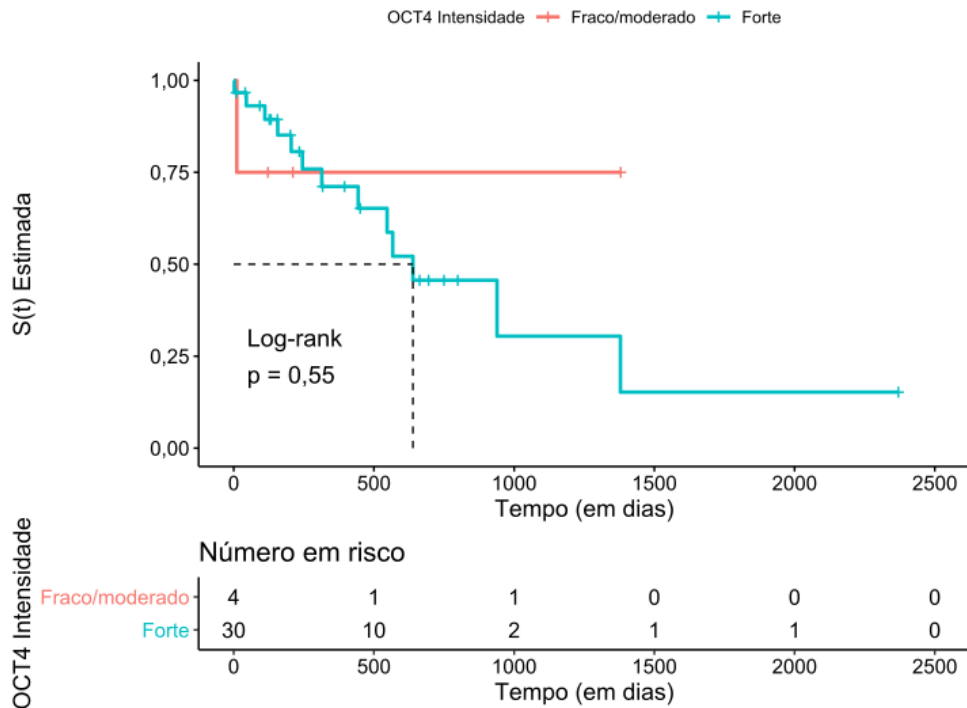
**Graph 2 - Kaplan-Meier Curves for Intensity - CD133**



**Graph 3 - Kaplan-Meier Curves for Intensity – CD24**



**Graph 4 - Kaplan-Meier Curves for Intensity – OCT4**



## DISCUSSION

Cancer stem cells (CSCs) have recently been associated with cancer progression and used to identify the prognostic factors and targets for therapy in several types of cancer<sup>(14)</sup>. It is notable that the role of CSCs is not well understood or characterized in pancreatic cancer. Moreover, few reports have been published on the patterns and effects of the presence of CSCs. Considering this lack of data, we retrospectively analyzed the expression of CSCs in samples of pancreatic cancer using immunohistochemistry and verified its role in tumor progression and therapeutic resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma.

The molecular biology of pancreatic cancer is directly related to its rapid progression and low therapeutic response. It is well documented that the appearance of a tumor cell is the result of an accumulation of mutations in its DNA capable of morphologically and functionally altering it<sup>(5-6)</sup>. The trigger of this process and all its evolution, culminating in the formation of the tumor cell and its pertinent characteristics, characterize the carcinogenesis process, is already significantly elucidated for several types of neoplasias. However, for certain types of cancer such as pancreatic cancer, the process remains uncertain<sup>(12)</sup>.

Most malignant tumors follow a natural history that can be divided into four stages: malignant transformation, tumor cell growth, local invasion, and metastasis. The process of carcinogenesis, or malignant transformation, occurs in various stages and results due to the accumulation of genetic changes and mutations, which are triggered by several factors, including environmental factors such as radiation and chemicals<sup>(15)</sup>. However, for this process of carcinogenesis to progress, it may be necessary to have certain cells with the stem cell characteristics, such as the potential for self-renewal and regeneration, as well as a high proliferative index.

Recent evidence suggests that stem cells play a crucial role in not only the generation and maintenance of different tissues but also the development and progression of certain types of tumors<sup>(8)</sup>. For several solid tumors, they have been shown to harbor a distinct subpopulation of tumor cells that have stem cell characteristics and are therefore called tumor stem cells (CTTs) or tumorigenic cells<sup>(16)</sup>. Cancer stem cells appear to be able to initiate and drive tumour growth in solid tumours. CD133, CD24 and OCT4 are recently reported prospective markers for CSCs, expressed in a variety of tumours; however, to our knowledge, no attempt has been made to detect their expression in pancreatic cancer specimens<sup>(17)</sup>.

It can be observed that tumor stem cells, or tumor stem cell surface markers such as CD133, CD24, and OCT4 are present in pancreatic cancer tumor cells, confirming the intrinsic relationship between the pancreatic malignant phenotype and the presence of stem cells. No significant difference was observed between antibody expression and the degree of tumor differentiation, assuming that tumor stem cells have been present since tumor initiation. It should be noted that for CD133 and CD24 antibodies, the percentage of marker-expressing tumor cells increased as the tumor progressed. Hence, the more aggressive, poorly differentiated tumors exhibited greater positivity for the presence of the antibody. While on the other hand, the expression of the OCT4 antibody was higher and more intense in well-differentiated tumors; thus, the more differentiated the tumor, the greater the labeling. Cells that have the stem cell marker for the OCT4 antibody have a higher potential for differentiation<sup>(18)</sup>. This may be the reason why OCT4 differed in terms of expression from the other markers that were tested, although these differences were not statistically significant.

Oct4 marker is only present focally in tumor samples that were positive. This find is in agreement with the theory that CSCs represent only a very small portion of the total tumour cell population(19). For example, CD133 positive cells were detected in 0.7– 6.1% (Ricci-Vitiani et al, 2007), 1.8–24.5%(20) of primary colon cancer cells, and in 0.7– 3.2% of primary pancreatic cancer cells using flow cytometric analysis(21). Immunohistochemical staining revealed CD133 expression in 1–3% of hepatocellular carcinoma specimens(22).

Although labeling and expression were observed with a relatively high frequency in all degrees of tumor direction, for example, tumors expressed labeling for cancer stem cells regardless of the degree of differentiation, some findings favor the hypothesis that the number of stem cells in tumors is larger in tumors with more aggressive behavior and with worse prognosis. This hypothesis is supported by the fact that CD133 was more frequently expressed in individuals who underwent only palliative treatment (95.1%) with a significant association ( $p$  value  $< 0.05$ ) between the presence of antibody and palliative treatment. When it is reported that a patient underwent only palliative treatment, it is assumed that the tumor was at a significantly advanced stage and with no possibility of curative surgical intervention and therefore only palliative treatment was performed. Similarly, it can be overstated that the more aggressive tumors at later stages express greater labeling for the CD133 tumor stem cell antibody. Several clinical studies have investigated the relationship between the CD133 expression and clinical outcomes of tumors; however, the results are controversial. For example, CD133 expression is related to the poor prognosis of colon cancer and hepatocarcinoma<sup>(23)</sup>.

Regarding the TNM stage, the labeling of the three antibodies (CD133, CD24, and OCT4) did not change along the progression. It is notable that the tumor stem cells were present from the earliest stage and that they do not enlarge during the staging. The prevalence of the three antibodies and their associations with the variables was generally high, although not all the antibodies had a significance level lower than  $p < 0.05$ .

All the variables that contributed to an unfavorable prognosis, such as the location of the pancreatic head tumor, advanced age, and the presence of metastases were all associated with high prevalence especially for the expression of CD133 and CD24. Additionally, this corroborated with the idea that tumor stem cells

when present are associated with rapid tumor progression and therapeutic resistance. Cancer stem cells have certain characteristics similar to those of normal organism stem cells, such as the ability to self-regenerate and pluripotency, giving rise to heterogeneous tumor cell lines that form the same tumor<sup>(9)</sup>. Cancer stem cells are likely to share many of the properties of normal stem cells that provide for a long lifespan, including relative quiescence, resistance to drugs and toxins through the expression of several transporters, an active DNA-repair capacity and a resistance to apoptosis. Therefore, tumours might have a built-in population of drug-resistant pluripotent cells that can survive chemotherapy and repopulate the tumour<sup>(24)</sup>.

In order to define if CSCs predicted the clinical outcome, we performed Kaplan-Meier survival analysis and showed that the groups presented very similar curves. Hence, the log-rank test does not indicate significant difference between the curves regarding the presence of the three antibodies. Although they are associated with worse prognostic variables such as metastasis and palliative treatment therapeutic options, no association can be made between the presence of tumor stem cells and patient survival in this case; therefore, the presence of CSCs does not predict worse survival.

## **CONCLUSION**

The discovery of cancer stem cells in solid tumours has changed our view of carcinogenesis. That tumor stem cells are involved in tumor development and progression is a fact, since their presence were significant in the vast majority of tissues analyzed and, recently, many studies have associated the presence of tumor stem cells with the development of several types of cancer.

The process of tumorigenesis, as far as the subject is known until now, involves the progressive acquisition of multiple aberrant mutations that culminate in the expansion and proliferation of more aggressive cell subpopulations, contributing to tumor progression and growth. Although this theory is well established, the identification of cells that are capable of causing the tumor progression is still the subject of many studies to better characterize the carcinogenesis process and identify these cells.

Much of the information we obtain and use for the diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic neoplasms derives from heterogeneous populations with varying degrees of maturation and differentiation. It is becoming increasingly urgent to characterize the CSCs for the evaluation and characterization of the carcinogenic route of the most aggressive tumors. The direct consequence is the development of therapeutic strategies that can act on CSCs and the possibility to determine, by an easily accessible method, which patients will benefit most from this type of treatment.

## REFERENCES

1. Barbosa IR, Santos CA, Souza DLB. Pancreatic cancer in Brazil: mortality trends and projections until 2029. *Arq. Gastroenterol.* 2018; 55(3): 230-236.
2. Soto JL, Barbera VM, Saceda M, Carrato A. Molecular biology of exocrine pancreatic cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006; 8(5): 306-12.
3. Sakorafas GH, Tsiotou AG, Tsiotou GG. Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumor suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer Treat Rev.* 2000; 26(1): 29-52.
4. Allegra E, Trapasso S. Cancer stem cells in head and neck cancer. *OncoTargets Ther.* 2012; 5: 375-383.
5. Fang Y, Yao Q, Chen Z, Xiang J, William FE, Gibbs RA, et al. Genetic and molecular alterations in pancreatic cancer: implications for personalized medicine. *Med Sci Monit.* 2013; 19: 916-26.
6. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007; 445(7123): 111-15.
7. Li D, Jiao L. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 2003; 33(1): 3-14.
8. Balic A, Dorado J, Alonso-Gómez M, Heeschen C. Stem cells as the root of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Cell Res.* 2012; 318(6): 691-704.
9. Mei-Hui T, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2005; 26(2): 495-502.
10. Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res.* 2012; 2(3): 340-56.



11. Ansari D, Chen BC, Dong L, Zhou MT, Andersson R. Pancreatic cancer: translational research aspects and clinical implications. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(13): 1417-24.
12. Kobayashi NC, Noronha SM. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. *Rev Assoc Med Bras*. 2015; 61(1): 86-93.
13. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4(7): 844-7.
14. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(4): 275-84.
15. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci*. 2018; 25(20).
16. Matsuda Y, Kure S, Ishiwata T. Nestin and other putative cancer stem cell markers in pancreatic cancer. *Med Mol Morphol*. 2012; 45(2): 59-65.
17. Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, et al. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2008; 98(8): 1389-97.
18. Villodre ES, Kipper FC, Pereira MB, Lenz G. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *Cancer Treat Rev*. 2016; 51: 1-9.
19. Phi LTH, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, et al. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int*. 2018; 5416923.
20. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445: 106-10.
21. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(3): 313-23.
22. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*. 2007; 132: 2542-56.
23. Cai X, Li J, Yuan X, Xiao J, Dooley S, Wan X, et al. CD133 expression in cancer cells predicts poor prognosis of non-mucin producing intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Transl Med*. 2018; 16:50.
24. Marques DS1, Sandrini JZ, Boyle RT, Marins LF, Trindade GS. Relationships between multidrug resistance (MDR) and stem cell markers in human chronic myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res*. 2010; 34(6): 757-62.

## Supplementary Bibliography

Abraham BK, Fritz P, Mcclellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(3): 1154-9.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(7): 3983-8.

Almadi MA, Alharbi O, Azzam N, Altayeb M, Javed M, Alsaif F, et al. Clinical predictors of resectability of pancreatic adenocarcinoma. *J Gastroenterol.* 2013; 19(6): 278-85.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 10946-51.

Dorado J, Lonardo E, Miranda-Lorenzo I, Heeschen C. Pancreatic cancer and stem cell: new insights and perspectives. *J Gastroenterol.* 2011; 46(8): 956-73.

Gnoni A, Licchetta A, Scarpa A, Azzariti A, Brunetti AE, Simone G, et al. Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(10): 19731-62.

Hidalgo M. Pancreatic cancer. *New Engl J Med.* 2010; 362(17): 1605-17.

Hruban RH, Adsay NV. Molecular classification of neoplasms of the pancreas. *Hum Pathol.* 2009; 40(5): 612-23.

Iki K, Pour PM. Expression of Oct4, a stem cell marker, in the hamster pancreatic cancer model. *Pancreatol.* 2006; 6(4): 406-413.

Magalhães GM, Terra EM, Calazans SG, Vasconcelos RO, Alessi AC. Avaliação da imunomarcção de células-tronco tumorais em carcinossarcomas mamários e carcinomas em tumores mistos em cadelas. *Pesq Vet Bras.* 2014; 34(5): 455-61.

Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, Miyaki AM, Malheiros SMF, Mamani JB, et al. Isolamento, cultivo e caracterização de células tronco CD133+ de glioblastoma humano. *Einstein.* 2012; 10(2): 197-202.

Saigusa S, Tanaka K, Toyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Am Surg Oncol.* 2009; 16(12): 3488-98.

Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature.* 2005; 435(7046): 1262-6.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de muitas evidências hoje apontarem para a existência de células-tronco tumorais (CTTs) no processo de carcinogênese, esse assunto ainda é controverso e precisa de maiores estudos. A pesquisa e caracterização de células tronco tumorais é crucial no entendimento do câncer enquanto doença. Muitas das informações que obtemos e utilizamos para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias deriva de populações heterogêneas, com diferentes graus de maturação e diferenciação. Cada vez mais a literatura firma a idéia de que o câncer é um tecido ou unidade-tecidual que se desenvolve com suas próprias células tronco, assumindo um crescimento que não corresponde ao padrão do organismo.

O câncer, com poucas exceções, é efetivamente tratado quando detectado precocemente. Talvez no Câncer de pâncreas um dos maiores desafios seja esta detecção precoce, pois a maioria dos tumores já apresenta estágio avançado quando detectado em função dos sintomas. A existência de biomarcadores para as células tronco tumorais seria útil para o diagnóstico e tratamento da doença. Contudo, os estudos apresentados até o momento no campo das células tronco não são completamente conclusivos, pois cada marcador pode variar entre pacientes e de acordo com o tipo de câncer.

Neste momento, cada vez mais se torna urgente a caracterização das células tronco tumorais para a avaliação e caracterização da rota carcinogênica dos tumores mais agressivos, com consequência direta no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que consigam atuar sobre as células tronco, seja agindo no microambiente que suporta essas células, seja prevenindo a angiogênese ou interferindo nas vias de sinalização, ainda não totalmente compreendidas nas CTTs.

Essas estratégias deverão considerar a especificidade dos marcadores das células tronco, que as tornam resistentes aos quimioterápicos. Todas as terapias tradicionais incluindo cirurgia, terapia hormonal, terapia anti-angiogênica e imunoterapia evidenciam uma baixa eficácia em termos de desfecho e sobrevida devido à falta de um alvo terapêutico específico que atue na atividade de proliferação e regeneração das células-tronco.

Uma vez que qualquer célula-tronco tumoral residual pode causar recaída da doença devido ao alto índice de proliferação dado a uma única célula, precisamos

saber mais sobre sua identificação, bem como o que acontece em suas vias de sinalização, o que lhes dá esse poder pluripotente descontrolado, para que futuros medicamentos possam visar apenas CTTs, e não células-tronco saudáveis, que são fundamentais para manter o corpo humano. Uma vez identificadas, a terapia pode ser direcionada para erradicação do tumor sem possibilidade de recorrência da neoplasia.

No campo do câncer de pâncreas os estudos ainda estão pouco concretizados, trabalha-se muito encima de hipóteses, questionamentos suscitam e embasam novas pesquisas, porém pouca aplicabilidade clínica se tem visto fruto dos recentes estudos. A descoberta de células-tronco cancerígenas em tumores sólidos mudou nossa visão da carcinogênese. O fato de as células-tronco tumorais estarem envolvidas no desenvolvimento do tumor e a progressão é fato, pois sua presença foi significativa na grande maioria dos tecidos analisados e, recentemente, muitos estudos associaram a presença de células-tronco tumorais ao desenvolvimento de vários tipos de câncer. Muitos biomarcadores hoje usados na detecção de alguns tipos de tumores surgem apenas quando a neoplasia já está instalada, enquanto que os marcadores de células tronco tumorais por estarem presentes desde a iniciação do processo de tumorigênese podem permitir uma detecção precoce, em estágio bem inicial do tumor.

O processo de tumorigênese, até o que se compreende do assunto até agora, envolve a aquisição progressiva de múltiplas mutações aberrantes que culminam na expansão e proliferação de subpopulações de células mais agressivas, contribuindo para a progressão e crescimento do tumor. Embora essa teoria esteja bem estabelecida, a identificação de células capazes de causar a progressão do tumor ainda é objeto de muitos estudos para melhor caracterizar o processo de carcinogênese e identificar essas células. É cada vez mais urgente caracterizar as CSCs para a avaliação e caracterização da via carcinogênica dos tumores.

O diagnóstico tardio do adenocarcinoma ductal pancreático associado a resposta limitada aos atuais tratamentos resultam em um prognóstico extremamente reservado. A crescente compreensão dos eventos moleculares na tumorigênese está levando à identificação de biomarcadores que nos permitem prever a resposta ao tratamento e ainda o surgimento de novos alvos terapêuticos. Portanto, terapêutica-alvo, painel prognóstico e marcadores diagnósticos deste subconjunto

de células e as vias de definir a sua tumorigênese é uma grande promessa para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para a melhoria e erradicação desta forma tão letal que é o câncer de pâncreas.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Com o conhecimento das vias de sinalização alteradas no metabolismo das células tronco tumorais, a formação de novos tumores poderá ser evitada com drogas capazes de interferir nessa via carcinogênica;
- Conhecimento em relação ao papel das células tronco tumorais no câncer de pâncreas, bem como a sua associação clínica com a progressão da doença e resistência terapêutica;
- Com relação à recorrência da neoplasia, exames periódicos seriam capazes de detectar “restos” dessas células, que podem ser destruídas mesmo antes da recorrência do tumor, aumentando significativamente as chances de cura;
- Em pacientes com histórico familiar da doença e pessoas com fatores de risco identificáveis, a detecção dessas células poderia proceder uma investigação adicional a ser realizada periodicamente, auxiliando assim na prevenção;
- Incorporação de novas técnicas a serem utilizadas no estudo no rol de procedimentos da Instituição envolvida, determinando sua acurácia e efetividade; permitindo sua aplicação em estudos futuros e até mesmo na prática assistencial futura.

## 10. ANEXOS

### Ficha de coletas de dados:

Protocolo de pesquisa de dados no prontuário	
Idade	____ anos
Sexo	( ) Feminino ( ) Masculino
Data do início dos sintomas	____/____/____
Data da primeira consulta	____/____/____
Realizou biópsia?	( ) Não ( ) Sim
Tipo de cirurgia realizada	( ) duodenopancreatectomia total ( ) pancreatectomia parcial ( ) tumor irresssecável/Tto paliativo
Data da cirurgia	____/____/____
Estadiamento	( ) Não se aplica  T__ N__ M__
Data do óbito do paciente	( ) Não se aplica  ( ) ____/____/____
Data da última vez em que se soube que o paciente estava vivo	( ) Não se aplica  ( ) ____/____/____



<b>Protocolo de pesquisa de dados no laudo anatomopatológico original</b>	
Tipo de espécime recebido	<input type="checkbox"/> Duodenopancreatectomia <input type="checkbox"/> Pancreatectomia parcial <input type="checkbox"/> Biópsia
Tamanho do tumor (maior medida)	_____ cm
Tipo histológico do tumor	<input type="checkbox"/> Adenocarcinoma <input type="checkbox"/> Neuroendócrino <input type="checkbox"/> Outro: _____ _____
Grau histológico de diferenciação do tumor	<input type="checkbox"/> Bem diferenciado <input type="checkbox"/> Moderadamente diferenciado <input type="checkbox"/> Pouco diferenciado <input type="checkbox"/> Indiferenciado
Estadiamento patológico	<input type="checkbox"/> Não se aplica pT_____ N _____ M _____
Presença de neoplasia intraepitelial adjacente ao tumor	<input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

Classificação da neoplasia intraepitelial	<input type="checkbox"/> Não se aplica  <input type="checkbox"/> NIPan 1 <sup>a</sup>  <input type="checkbox"/> NIPan 1B  <input type="checkbox"/> NIPan 2  <input type="checkbox"/> NIPan 3
Local da metástase se presente	<hr/> <hr/> <hr/>
Data do laudo	____/____/____

## 11 – STROBE

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
<b>Title and abstract</b>		<p>Evaluation of Tumor Stem Cells in Pancreatic Cancer by Tissue Microarray Immunohistochemistry</p> <hr/> <p><b>Background:</b> Pancreatic ductal adenocarcinoma(ADP) is a highly aggressive disease usually diagnosed in advanced stages and for which few effective therapies are available.</p> <p><b>Objective:</b> Study the expression profile of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma by immunohistochemistry.</p> <p><b>Design:</b> Study samples of pancreatic cancer (ADP) cases.</p> <p><b>Patients/Setting:</b> Cases diagnosed between the years 2005 and 2010, which will be selected from the routine care of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, at the Department of Pathology</p> <p><b>Outcome:</b> Results were obtained by establishing a correlation between markers stem cells with pancreatic adenocarcinoma.</p> <p><b>Measurements:</b> statistical associations are found between the expression of tumor cells with prognostic factors and clinical variables involved in this study. To describe the prevalence were used simple proportion to its 95% confidence interval determined by the bimodal distribution. Quantitative variables were compared by the Student t-test and Fischer. For comparison of categorical variables were analyzed using the chi-square test and survival analysis will be used the Kaplan-Meier method.</p>
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	2	Among the processes most recently implicated in carcinogenesis and tumor progression, changes in cancer stem cells (CSCs) are still poorly studied in pancreatic cancer with no satisfactory results, and are deserving of greater efforts in elucidating their effects and relationship with the acquisition of a pancreatic malignant phenotype. Recent evidence has suggested that CSCs play a crucial role not only in the generation and maintenance of different tissues, but also in the development, progression, and therapeutic resistance of different tumor types.
Objectives	3	To study the expression profile of CSC markers in pancreatic ductal adenocarcinoma by immunohistochemistry. This will be accomplished by analyzing the tumor pancreatic cell labeling profile by CD24, CD133, and OCT4 staining using tissue microarray techniques on samples from pancreatic resection and biopsies and further correlating findings with clinical data, therapeutic responses, overall survival, and disease-free survival of the patients included in the study to determine the prognostic role of the previously described markers .
<b>Methods</b>		
Study design	4	The design of the proposal is a cross-sectional study. The factors are the expression profiles of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma tissue through imunohistoquímical techniques.
Setting	5	The study sample consist of all cases of pancreatic ductal adenocarcinoma, diagnosed between 2005 and 2010, selected from the care routine of Hospital

		de Clinicas de Porto Alegre, with the Service pathology and Group bile and Pancreas routes.
Participants	6	Not applicable
Variables	7	Positive nuclear or cytoplasmic labeling for each antibody was measured for intensity, and dichotomously classified into low/moderate or strong intensity groups. Histopathological variables will be discussed: the histological type of carcinoma and adenocarcinoma grade. Clinical variables that will be checked are: age, sex, stage at diagnosis, type of treatment performed (including surgical treatment and chemotherapy), treatment response, survival and mortality.
Data sources/ measurement	8*	Not applicable
Bias	9	Not applicable
Study size	10	According to the statistical calculations done in the Group of Research and Graduate Studies of the Porto Alegre University Hospital, it will take 28 ADP blocks and their respective normal tissue or adjacent to the tumor to detect a difference of proportions considering 60% prevalence in tumor tissue and 20% prevalence in normal tissue, with a significance level of 5% and a power of 80%.
Quantitative variables	11	Not applicable
Statistical methods	12	A descriptive statistical analysis of the data found (the expression of markers) were made; statistical associations are found between the expression of tumor cells with prognostic factors and clinical variables involved in this study. Initially quantitative data are reported as mean and standard deviation, and categorical data by frequencies. To describe the prevalence were used simple proportion to its 95% confidence interval determined by the bimodal distribution. Quantitative variables were compared by the Student t-test and Fischer. For comparison of categorical variables were analyzed using the chi-square test and survival analysis were used the Kaplan-Meier method. For all analyzes were used an alpha level of 0.05 to accept their statistical significance.
		(b) Not applicable
		(c) Not applicable
		(d) The experimental sample consist of pancreatic adenocarcinoma tissue paraffin blocks (from cancer patients), which were selected through the search in case files with the histologic diagnosis of adenocarcinoma, after review their respective blades by the researcher, the period from that study. For each selected event, ideally, were include a paraffin block comprising the pancreatic adenocarcinoma, which were submitted to the research of antibodies referred to in objectives.
		(e) Not applicable

Continued on next page

**Results**

Participants	13*	(a) Not applicable (b) Not applicable (c) Not applicable
Descriptive data	14*	(a) The three cancer stem cell markers (CSCs) tested exhibited positivity in pancreatic cancer neoplastic cells, corroborating the hypothesis of the existence of CSCs in the development and maintenance of the pancreatic aggressive phenotype. Significant association was observed between the presence of some stem-tumor cell markers with worse prognostic variables, such as the presence of metastasis ( $p = 0.037$ ), and type of treatment performed (only palliative treatment possibility; $p = 0.019$ ). The degree of tumor differentiation was related, although not significant, to antibody positivity, where CD133 and CD24 showed a high prevalence in more aggressive, poorly differentiated tumors, while cells expressing the OCT4 antibody showed a higher potential for differentiation. Positive labeling throughout the TNM stage was uniform, did not broaden as the stage progressed, and was present from the very early stages of the tumor. Overall, disease-free survival was not related to antibody expression. (b) Not applicable (c) Not applicable
Outcome data	15*	Not applicable Not applicable Different populations of tumor cells were investigated in the proposed design, by assessing expression in tumor pancreatic cells, based on the use of combinations of surface markers which permit its characterization. Study samples consist of ADP cases, diagnosed between the years 2005 and 2010, which were selected from the routine care of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, at the Department of Pathology. Antibodies to CD133,CD24 and OCT4 were tested for the detection of tumor cells with cancer stem cells expression, with subsequent correlation of results with clinical data, tumor progression, response to therapy, and survival.
Main results	16	(a) Not applicable (b) Not applicable (c) Not applicable
Other analyses	17	Not applicable

**Discussion**

Key results	18	Immunohistochemical findings correlate with clinical, therapeutic response, overall survival and disease-free patients included in the study to determine the prognostic role of antibodies. This project will therefore contribute to the expansion of knowledge related to the molecular aspects of pancreatic cancer, as well as its association with clinical disease progression and therapeutic resistance. Results will also contribute to a better understanding of role cancer stem cells and their relationship with the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma.
Limitations	19	Were deleted only samples whose material has artifacts that could harm immunohistochemical assessment, as autolysis, necrosis, mechanical devices (crushing), thermo-electric devices, tiny sample material for immunohistochemical assessment or paraffin blocks which are no longer available in the archive.
Interpretation	20	Research and characterization of cancer stem cells is crucial for the better understanding of pancreatic cancer as a disease. Much of the information obtained is used for the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic tumors derived from heterogeneous populations with varying degrees of maturation and differentiation. Characterization the carcinogenic route of more aggressive tumors and their association with cancer stem cells presence will possibilit the development of therapeutic strategies that can act on this patchyway and the possibility of

---

determining, by a method of easy access, which most patients will benefit from this type of treatment.

---

Generalisability 21 This project will therefore contribute to the expansion of knowledge related to the molecular aspects of pancreatic cancer, increasing the comprehension of the role cancer stem cells in this type of tumor, as well as its association with clinical disease progression and therapeutic resistance. Results will also contribute to a better understanding of cancer stem cells and their relationship with the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. The proposed project will stimulate the training of students and technicians, enabling the incorporation of new techniques to the list of procedures of the institutions involved, and allowing its use in translational studies and even in long-term care practice.

---

**Other information**

---

Funding 22 In relation to financial resources, was required financial support to the Fund for the Encouragement of Research of Porto Alegre Clinical Hospital (FIPE-HCPA), via WebGPPG budget for funding and aid spent on processing blocks, slides preparation, standardization antibodies and immunohistochemical analyzes.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).