



Rui Vasco Quintais Gradiz

A RADIOTERAPIA METABÓLICA NO TRATAMENTO DO ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, Ramo de Medicina, Especialidade de Patologia (Fisiopatologia — Patologia Geral), orientada por Professora Doutora Anabela Mota Pinto e Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Rui Vasco Quintais Gradiz

A Radioterapia Metabólica no Tratamento do Adenocarcinoma Pancreático

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, Ramo de Medicina,
Especialidade de Patologia (Fisiopatologia – Patologia Geral), orientada por
Professora Doutora Anabela Mota Pinto e Professora Doutora Maria
Filomena Rabaça Roque Botelho e apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra

2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Capa:

Pâncreas – representação artística.

Tese apresentada à Universidade de Coimbra no âmbito do Doutoramento em Ciências da Saúde, para candidatura ao grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo de Medicina, especialidade de Patologia (Fisiopatologia – Patologia Geral), realizada sob orientação científica da Professora Doutora Anabela Mota Pinto e da Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho.

Agradecimentos

À Professora Doutora Anabela Mota Pinto e à Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, minhas Orientadoras, por terem aceitado desempenhar essa função, pelos recursos físicos e humanos que disponibilizaram para a execução deste projeto de investigação, pela paciência que demonstraram pelos meus erros e omissões, e pelo tempo que dedicaram à revisão desta Tese. O meu sincero muito obrigado.

À Professora Doutora Lina Carvalho, à Dra. Ana Alarcão e à Mestre Ana Filipa Ladeirinha do Instituto de Anatomia Patológica da FMUC, à Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva e ao Dr. Luís Mesquita do Instituto de Genética Médica da FMUC, à Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e à Mestre Ana Cristina Gonçalves do Laboratório de Oncobiologia e Hematologia (LOH) da FMUC, ao Professor Doutor Manuel Santos Rosa, Dr. Paulo Santos e Dra. Vera Alves do Instituto de Imunologia da FMUC, à Dra. Helena Donato do Serviço de Documentação do CHUC, ao Professor Doutor Francisco José Caramelo do Laboratório de Informática do Instituto de Biofísica/Biomatemática da FMUC, à Professora Doutora Ana Margarida Abrantes e Mestre Catarina Mamede do Instituto de Biofísica/Biomatemática da FMUC, à Mestre Sofia Vale Pereira, Mestre Rita Ambrósio e Leonor Salguinho do Instituto de Patologia Geral da FMUC.

A todos os que anonimamente contribuíram para esta investigação.

Ao Serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pela cedência do ^{99m}Tc -TOC, e ao Serviço de Medicina Nuclear do Instituto Português de Oncologia do Porto, pela cedência do ^{68}Ga -DOTA-NOC e do ^{177}Lu -DOTA-TATE.

Ao CIMAGO, Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia da FMUC, pelo apoio financeiro e científico ao projeto, e à Sociedade Portuguesa de Gastreenterologia, pela concessão de uma Bolsa de Investigação.

Aos meus pais, a quem dedico esta Tese.

Índice

Resumo	I
Abstract	V
Abreviaturas e Acrónimos.....	IX
1. Introdução	1
1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático	1
1.2. Lesões precursoras.....	8
1.3. Estadiamento	10
1.4. Genética	13
1.5. Células estaminais.....	17
1.6. Transição epitelial-mesenquimal	18
1.7. Diferenciação neuroendócrina.....	20
1.8. Tratamento do adenocarcinoma pancreático ductal.....	20
1.9. Tumores neuroendócrinos do pâncreas, classificação e tratamento	25
1.10. Recetores da somatostatina, análogos da somatostatina e análogos da somatostatina radiomarcados	30
1.11. Recetores da neurotensina	35
2. Hipótese	39
3. Objetivos	41
3.1. Objetivo principal.....	41
3.2. Objetivos secundários	41
4. Materiais e Métodos	43
4.1. Cultura celular.....	43
4.2. Perfil morfológico das linhas celulares.....	44
4.2.1. Imunofenotipagem	44
4.2.2. Citometria de fluxo	48
4.3. Perfil genético das linhas celulares	51
4.3.1. Extração do ADN	52
4.3.2. Quantificação do ADN.....	54

4.3.3. Genotipagem	55
4.3.3.1. Reação de polimerização em cadeia (PCR)	55
4.3.3.2. Sequenciação do ADN	58
4.3.3.3. Instabilidade de microssatélites.....	59
4.4. Estudos de captação com análogos da somatostatina	61
4.5. Estudo dos recetores de somatostatina	62
4.6. Modulação celular com citostáticos	63
4.6.1. Avaliação da atividade metabólica das células	64
4.6.2. Avaliação da viabilidade e da morte celulares	65
4.6.3. Avaliação do ciclo celular	66
4.7. Perfil morfológico das células após quimioterapia	67
4.8. Avaliação dos recetores de somatostatina após ação quimiossensibilizante dos citostáticos.....	68
4.9. Estudos de captação após modulação celular com citostáticos	68
4.10. Perfil morfológico dos xenotransplantes	69
4.11. Pesquisa Bibliográfica	70
4.12. Análise estatística	70
5. Resultados	73
5.1. Perfil morfológico das linhas celulares.....	73
5.1.1. Imunofenotipagem	73
5.1.2. Citometria de fluxo	78
5.2. Perfil genético das linhas celulares	83
5.3. Estudos de captação com análogos da somatostatina	89
5.4. Estudo dos recetores de somatostatina	92
5.5. Modulação celular com citostáticos	93
5.5.1. Avaliação da atividade metabólica das células	94
5.5.2. Avaliação da viabilidade e da morte celulares	102
5.5.3. Avaliação do ciclo celular	109
5.6. Perfil morfológico das células após quimioterapia	121

5.7.	Análise dos recetores da somatostatina após ação quimiossensibilizante dos citostáticos.....	134
5.8.	Estudos de captação após modulação celular com citostáticos	140
5.9.	Perfil morfológico dos xenotransplantes	142
6.	Discussão	148
6.1.	Perfil morfológico das linhas celulares.....	148
6.1.1.	Variedade morfológica.....	148
6.1.2.	Imunohistoquímica	149
6.1.3.	Fenótipo de transição epitelial-mesenquimal	151
6.1.4.	Células estaminais.....	152
6.2.	Perfil genético das linhas celulares	156
6.3.	Captação dos análogos da somatostatina e recetores da somatostatina.....	163
6.4.	Modulação celular com citostáticos	166
6.4.1.	Atividade metabólica	166
6.4.2.	Avaliação da viabilidade e da morte celulares	169
6.4.3.	Avaliação do ciclo celular	172
6.5.	Análise dos recetores da somatostatina após ação quimiossensibilizante dos citostáticos.....	174
6.6.	Estudos de captação após modulação celular com citostáticos	177
7.	Conclusões	183
8.	Perspetivas futuras	189
	Índice de Tabelas	191
	Índice de Figuras	193
	Índice de Gráficos	196
	Bibliografia	200

Resumo

O adenocarcinoma ductal pancreático constitui cerca de 90% de todos os tumores do pâncreas. Aquando do diagnóstico o tumor já está localmente avançado ou metastizado, sendo resistente à quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Neste trabalho propusemo-nos investigar se a radioterapia dirigida a recetores de peptídeos, quando associada à quimioterapia, pode representar uma forma alternativa e sinérgica de tratamento.

Para esse fim, seleccionámos duas linhas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático, a MIA PaCa-2 e a PANC-1 com diferenciação neuroendócrina e recetores de somatostatina. Para a sua caracterização fenotípica utilizámos imunohistoquímica e citometria de fluxo. Para a caracterização fenotípica por imunohistoquímica utilizámos marcadores epiteliais, mesenquimais, neuroendócrinos e recetores hormonais, como o anticorpo para o recetor da somatostatina 2. Para a caracterização fenotípica por citometria de fluxo na identificação de células estaminais, seleccionámos os marcadores CD24, CD44 CD326/ESA e CD133. Para o perfil genético pesquisámos, por PCR e sequenciação, mutações nos genes *KRAS*, *CDKN2A/p16^{INK4A}*, *TP53* e *SMAD4/DPC4* e, por eletroforese capilar estudámos instabilidade de microssatélites.

Efetuámos estudos de captação com três análogos da somatostatina radiomarcados, o ^{99m}Tc-TPC, o ⁶⁸Ga-DOTA-NOC, e o ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE e, por citometria de fluxo, estudámos, nas linhas celulares, a expressão dos recetores da somatostatina, SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5. Procedemos a ensaios de quimioterapia, com os citostáticos gemcitabina, 5-FU, docetaxel, everolimus e sunitinib, que compreenderam estudos da atividade metabólica por MTT, de viabilidade e morte celulares com anexina V/iodeto de propídio, do ciclo celular com iodeto de propídio/RNase, e do perfil imunohistoquímico após quimioterapia.

Analisámos, por citometria de fluxo, o efeito da incubação das linhas celulares com a concentração do IC50 das 72 h dos citostáticos selecionados, na expressão dos recetores da somatostatina. Seguiram-se estudos de captação do ^{177}Lu -DOTA-TATE após prévia incubação das linhas com a concentração do IC50 das 24 h.

Constituímos, em ratinhos Balb/c atímicos, xenotransplantes heterotópicos das linhas celulares e, nos tumores resultantes, estudámos o perfil imunohistoquímico.

A linha celular MIA PaCA-2 evidenciou a presença de dois tipos morfológicos de células, células grandes e células pequenas, e a linha PANC-1 três tipos, células grandes, células estreladas, e células pequenas. Este padrão manteve-se após tratamento com citostáticos e nos xenotransplantes. Nas linhas, após quimioterapia, e *in vivo*, nos xenotransplantes, ocorreram alterações isoladas do perfil imunohistoquímico observado inicialmente nas linhas sem exposição a citostáticos, com expressão ou ausência de expressão de alguns marcadores e recetores mas, para além da perda da E-caderina na linha MIA PaCA-2 e da expressão de sinaptofisina na linha PANC-1, após quimioterapia, não se observou um padrão específico e regular de alterações. As duas linhas expressam um fenótipo epitelial-mesenquimal, que se mantém após quimioterapia, e nos xenotransplantes, mas este fenótipo, por ausência da E-caderina, é mais agressivo na linha PANC-1. A linha MIA PaCA-1 evidenciou um fenótipo $\text{CD24}^- \text{CD44}^{+/++} \text{CD326}^{-/+}$ e $\text{CD133}/1^-$ e a linha PANC-1 $\text{CD24}^{-/+} \text{CD44}^+ \text{CD326}^{-/+}$ e $\text{CD133}/1^-$.

A linha celular MIA PaCa-2 apresentou uma mutação *missense*, sem heterozigotia, no codão 12 do *KRAS* (p.G12C; GGT>TGT), uma mutação *missense*, sem heterozigotia, no exão 7 do *TP53* (p.R248W) (CGG>TGG). A linha PANC-1 apresentou uma mutação *missense*, em heterozigotia, no codão 12 do *KRAS* (p.G12D; GGT>GAT) e duas variações *missense* em dois exões distintos do *TP53*, uma no exão 4 (p.P72R; CCC>CGC), que corresponde a um polimorfismo comum, e outra no exão 8

(p.R273H; CGT>CAT). A amplificação dos exões 1-3 do gene *CDKN2A/p16^{INK4A}* identificou uma deleção em homozigotia, incluindo os três exões, em ambas as linhas.

As duas linhas expressaram todos os recetores da somatostatina, com SSTR3, SSTR1 e SSTR2b predominando na linha MIA PACa-2, e SSTR2a e SSTR5 predominando na linha PANC-1. Os estudos de captação com ^{99m}Tc-TOC, ⁶⁸Ga-DOTA-NOC e ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE evidenciaram uma superior captação do ⁶⁸Ga-DOTA-NOC em ambas as linhas celulares. Os estudos demonstraram que todos os citostáticos conseguiram inibir a atividade metabólica das linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, com o docetaxel, e depois o sunitinib, revelando maior eficácia. Os estudos de viabilidade e morte evidenciaram que o sunitinib e o docetaxel foram os mais eficazes na indução de morte na linha MIA PaCa-2, e o sunitinib e a gemcitabina na linha PANC-1. A morte celular decorreu essencialmente por apoptose, com exceção do sunitinib, em que decorreu por apoptose/necrose. Os estudos de ciclo celular mostraram que, nas duas linhas, a sua paragem se deu essencialmente na fase G0/G1. Na linha PANC-1, para além da paragem em G0/G1, ocorreram paragens na fase S, com o 5-FU, e na fase G2/M, com o docetaxel. Após modulação celular com os citostáticos, ocorreu, nas duas linhas, de uma forma geral, aumento da expressão dos recetores. Este aumento foi mais pronunciado na linha PANC-1. Os estudos de captação do ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE após modulação celular com as concentrações do IC50 dos citostáticos às 24 h demonstraram, na linha MIA PaCa-2 um aumento da captação relativamente ao controlo com todos os citostáticos, com exceção do 5-FU. Na linha PANC-1 só ocorreu aumento da captação com o sunitinib.

Os resultados obtidos *in vitro* apoiam a hipótese de que a associação da quimioterapia, particularmente do sunitinib, à radioterapia dirigida a recetores de

peptídeos, particularmente com o ^{177}Lu -DOTA-TATE, tem efeito sinérgico, e pode representar uma opção na terapêutica do adenocarcinoma ductal pancreático.

Palavras-chave

Cancro do pâncreas; carcinoma ductal pancreático; linhas celulares tumorais; quimioterapia; tumores neuroendócrinos; recetores da somatostatina; análogos e derivados; sunitinib; recetores de peptídeos; lutécio.

Abstract

The pancreatic ductal adenocarcinoma represents about 90% of all the tumors of the pancreas. When the tumor is diagnosed it is already locally advanced or metastasized, being resistant to chemotherapy, radiotherapy and surgery. In this Thesis, we intend to investigate whether the radiation aimed at peptide receptors when combined with chemotherapy, can represent an alternative and synergistic way of treatment.

Therefore, we have selected two cell lines of pancreatic ductal adenocarcinoma, MIA PaCa-2 and PANC-1, with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. For their phenotypic characterization we used immunohistochemistry and flow cytometry. For the phenotypic characterization through immunohistochemistry we used epithelial markers, mesenchymal, neuroendocrine and hormone receptors, such as the antibody to the somatostatin 2 receptor. For the phenotypic characterization through flow cytometry in the identification of stem cells, we selected CD24, CD44 CD326/ESA and CD133 markers. For the genetic profile, we researched by PCR and sequencing mutations in the *KRAS*, *CDKN2A/p16^{INK4A}*, *TP53* and *SMAD4/DPC4* and, through capillary electrophoresis we analyzed the microsatellite instability.

We have performed uptake studies with three radiolabeled somatostatin analogues, ^{99m}Tc-TPC, ⁶⁸Ga-DOTA-NOC, and ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE and, through flow cytometry, we studied, in cell lines, the expression of the somatostatin receptors, SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 and SSTR5. We performed chemotherapy trials, with the cytostatics gemcitabine, 5-FU, docetaxel, everolimus and sunitinib, which comprised studies of metabolic activity by MTT, of cell viability and death with annexin V/propidium iodide, of the cell cycle with propidium iodide/RNase, and the immunohistochemical profile after chemotherapy.

We analyzed by flow cytometry the effect of the incubation of the cell lines with 72 h IC50 concentration of the selected chemotherapeutic agents, in the expression of the somatostatin receptors. This was followed by uptake studies of ^{177}Lu -DOTA-TATE after previous incubation of the cell lines with 24 h IC50 concentration.

We established in athymic Balb/c mice, heterotopic xenografts of the cell lines and, in the resulting tumors, we analyzed the immunohistochemical profile.

MIA PaCA-2 cell line evidenced the presence of two morphological types of cells: large cells and small cells, while PANC-1 cell line evidenced the presence of three types: large cells, stellate cells, and small cells. This pattern was maintained after treatment with cytostatic and in xenografts. In the lines after chemotherapy, and *in vivo* in xenografts, there were isolated changes of the immunohistochemical profile observed initially in the cell lines without exposure to cytostatic, with expression or absence of expression of some markers and receptors but, in addition to the E-cadherin loss in MIA PaCA-2 cell line and synaptophysin expression in PANC-1 line after chemotherapy, there was no specific and regular pattern of changes. Both lines express an epithelial-mesenchymal phenotype, which remains after chemotherapy, and in the xenografts, but this phenotype, due to lack of E-cadherin, is more aggressive in PANC-1 cell line. MIA PaCA-1 cell line has evidenced a phenotype $\text{CD24}^- \text{CD44}^{+/++} \text{CD326}^{-/+}$ and $\text{CD133}/1^-$ and PANC-1 cell line evidenced a phenotype $\text{CD24}^{-/+} \text{CD44}^+ \text{CD326}^{-/+}$ and $\text{CD133}/1^-$.

MIA PaCa-2 cell line presented a *missense* mutation, without heterozygosity at codon 12 of the *KRAS* (p.G12C; GGT>TGT) and a missense mutation, with no heterozygosity at exon 7 of the *TP53* (p.R248W) (CGG>TGG). PANC-1 cell line presented a *missense* mutation, with heterozygosity, at codon 12 of the *KRAS* (p.G12D; GGT>GAT) and two missense variations in two different exons of the *TP53*, one in the

exon 4 (p.P72R; CCC>CGC), which corresponds to a common polymorphism, and another in the exon 8 (p.R273H; CGT>CAT). The amplification of the exons 1-3 of the gene *CDKN2A/p16^{INK4A}* identified a deletion in homozygosity, including the three exons in both lines.

Both lines expressed all the somatostatin receptors, with SSTR3, SSTR1 and SSTR2b predominating in MIA PaCa-2 line, and SSTR2a and SSTR5 predominating in PANC-1 line. The uptake studies with ^{99m}Tc-TOC, ⁶⁸Ga-DOTA-NOC and ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE evidenced a higher uptake of the ⁶⁸Ga-DOTA-NOC in both cell lines. Studies have shown that all cytostatics were able to inhibit the metabolic activity of MIA PaCa-2 and PANC-1 cell lines, with docetaxel, and after the sunitinib, showing greater effectiveness. The viability and death studies have shown that sunitinib and docetaxel were the most effective in inducing death in MIA PaCa-2 line, and the sunitinib and the gemcitabine in PANC-1 line. Cell death occurred primarily through apoptosis, with the exception of sunitinib, in which it happened by apoptosis/necrosis. The cell cycle studies show that in both lines its stop occurred essentially in phase G0/G1. In PANC-1 line, besides the stop in G0/G1, there were other stops in phase S, with 5-FU, and in phase G2/M, with docetaxel. After cell modulating with the cytostatics, there was a general increase of the receptors expression in both lines. This increase was more pronounced in PANC-1 line. The uptake studies of ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE, after cell modulating with 24 h IC50 concentration of the cytostatics have shown, in MIA PaCa-2 line, an increase of the uptake regarding the control with all the cytostatics, except for the 5-FU. In PANC-1 line there was only an increase of the uptake with the sunitinib.

The *in vitro* results support the hypothesis that the combination of chemotherapy, particularly of sunitinib, with radiation aimed at peptide receptors, particularly with the

¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE, has a synergistic effect, and may represent an option in the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma.

Keywords

Cancer, pancreas; ductal carcinoma of the pancreas; cell lines, tumor; chemotherapy; neuroendocrine tumors; receptors, somatostatin; analogs and derivatives; sunitinib; receptors, peptide; lutetium.

Abreviaturas e Acrónimos

5-Fu – 5-Fluorouracilo

7-AAD – 7-Aminoactinomycin-D

ABCG2 – ATP-binding cassette sub-family G member 2

AC – Células em apoptose (*apoptosis cells*)

AC/NC – Células em apoptose e em necrose (*apoptosis and necrosis cells*)

ACTH – Hormona adrenocorticotrófica (*adrenocorticotropic hormone*)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADP – Adenocarcinoma ductal pancreático

Akt – *Protein kinase B*, também designada *PI3K Akt pathway*

APAF1 – Fator 1 ativador da protease apoptótica (*apoptotic protease activating factor 1*)

AV – Anexina V (*annexin-V*)

BAT – *Big adenine tract*

bFGF – Fator de crescimento de fibroblastos básico (*basic fibroblast growth factor*)

bp – Pares de bases (*base pairs*)

BRCA2 – Gene 2 do cancro da mama (*Breast cancer type 2, early onset*)

CDK – Cinases dependentes da ciclina (*cyclin-dependent kinase*)

Cdk4/6 - Cinase 4/6 dependente das ciclinas (*cyclin-dependent kinase 4/6*)

CDKI – Inibidor das cinases dependentes das ciclinas (*cyclin-dependente kinase inhibitor*)

CDKN2A – ciclina dependente de inibidores da cinase 2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

CGA – Cromogranina A (*chromogranin A*)

ChA – Cromogranina A (*chromogranin-A*)

CO₂ – Dióxido de carbono

COSMIC – *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*

CR – Resposta completa (*complete response*)

- CSC – Células estaminais do cancro (*cancer stem cells*)
- CXCR4 – Recetor tipo 4 da quimiocina C-X-C (*C-X-C Chemokine Receptor type 4*)
- DAB - 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato
- DMEM – Dulbecco's modified eagle's medium
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DOTA - 1,4,7,10-tetraaza ciclododecano-1,4,7,10-ácido tetracético (*1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetracetic acid*)
- DPC4 – Deletado no locus 4 do carcinoma pancreático (*deleted in pancreatic carcinoma locus 4*)
- DTPA – Ácido pentético ou ácido dietileno triamina pentacético (*pentetic acid or diethylene triamine pentoacetic acid*)
- EDTA – Ácido etilendiamina tetracético (*ethylenediamine tetracetic acid*)
- EGF - Fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor*)
- EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico (*epidermic growth factor receptor*)
- EKR – Cinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*)
- EMT – Transição epitelial-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition*)
- EpCAM – Molécula de adesão ao epitélio celular (*epithelial cell adhesion molecule*)
- ESA – Antígeno de superfície da célula epitelial (*epithelial cell surface antigen*)
- ESMO - Sociedade Europeia para a Oncologia Médica (*The European Society for Medical Oncology*)
- FAMM - Síndrome do melanoma e múltiplos nevos atípicos familiares (*familial atypical multiple mole melanoma*)
- FBS – Soro fetal bovino (*fetal bovine serum*)
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)
- FPT – Inibidores da farnesil-transferase (*farnesyl protein transferase inhibitors*)
- FSC – *Forward light scatter*
- GDP – Guanosina difosfato (*guanosine diphosphate*)

GEPNETs – tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos (*gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours*)

GH – Hormona de crescimento (*growth hormone*)

GIST – Tumores do estroma gastrontestinal (*gastrointestinal stromal tumors*)

GLP-1 – Peptídeo semelhante a glucagon 1 (*glucagon-like peptide-1*)

GSK-3 - *Glycogen synthase kinase 3*

GTP – Guanosina trifosfato (*guanosine triphosphate*)

h – Horas

HER2 - Recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico (*human epidermal growth factor receptor type 2*)

HS – Soro de cavalo (*horse serum*)

IC – Intervalo de confiança

IC50 – Dose letal média

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*insulin-like growth Factor I*)

IPMN – Neoplasias mucinosas papilares intra-ductais (*intraductal papillary mucinous neoplasm*)

KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LOH – Perda de heterozigotia (*loss of heterozygosity*)

MAPK – Proteína-cinase ativada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase*)

MAPKK - *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MCN – Neoplasia cística mucinosa (*mucinous cystic neoplasm*)

MDM2 – *Mouse double minute 2 homolog*

MDR – Gene da multirresistência aos fármacos (*multi-drug resistance gene*)

MEK – O mesmo que MAPKK, *mitogen-activated protein kinase kinase*

MET - Transição mesenquimatosa-epitelial (*mesenchymal to epithelial transition*)

MFI – Intensidade de fluorescência média (*mean fluorescence intensity*)

MMR – *Mismatch Repair*

MPM – Marcador de peso molecular

- MR – Resposta *minor* (*minor response*)
- MSI – Instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability*)
- MSS – *Microsatellite stable*
- mTOR - Alvo da rapamicina em células de mamífero (*mammalian target of rapamycin*)
- mTORC1 - *Mammalian target of rapamycin complex 1*
- nab* – Nanoparticle albumin-bounded
- NANETS - Sociedade Norte-Americana de Tumores Neuroendócrinos (*North American Neuroendocrine Tumor Society*)
- NC – Células necróticas (*necrosis cells*)
- NCAM – Molécula de adesão da célula neuronal (NCAM, *neural cell adhesion molecule*)
- NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*
- NED – Diferenciação neuroendócrina-*like* (*neuroendocrine-like differentiation*)
- NETs – Tumores neuroendócrinos (*neuroendocrine tumours*)
- NOC - 1-Nal(3)-octreótido
- NSE – Enolase neuroespecífica (*neuron specific enolase*)
- NTR – Recetor da neurotensina (*neurotensin receptor*)
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OR – Resposta objetiva (*objective response*)
- OS – Sobrevida global (*overall survival*)
- PanIN – Neoplasia intraepitelial pancreática (*pancreatic intraepithelial neoplasia*)
- PARP – *Poly (ADP-ribose) polymerase*
- PBS – Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered-saline*)
- PCR – Reação de polimerização em cadeia (*polymerase chain reaction*)
- PCSCs – Células estaminais pancreáticas (*pancreatic cancer stem cells*)
- PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas (*platelet-derived growth factor*)
- PET – Tomografia de emissão de positrões (*positron emitting tomography*)
- PFS – Sobrevida livre de progressão (*progression-free survival*)

- PI – Iodeto de propídeo (*propidium iodide*)
- PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinase*
- pNETSs – Tumores pancreáticos neuroendócrinos (*pancreatic neuroendocrine tumors*)
- PP – Polipeptídeo pancreático (*pancreatic polypeptide*)
- PR – Resposta parcial (*partial response*)
- PRRT – Terapia com radionuclídeos dirigida a recetores de peptídeos (*peptide receptor radionuclide therapy*).
- PS – Capacidade funcional (*performance status*)
- PUMA - P53 upregulated *modulator of apoptosis*
- QoL – Qualidade de vida (*quality of life*)
- Raf - *Rapidly accelerated fibrosarcoma*
- RB – Proteína do retinoblastoma
- RNAm – RNA mensageiro
- RS – Recetores de somatostatina
- RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real time-polymerase chain reaction*)
- s.c. - Subcutâneo
- SP – Side Population
- SSC – *Side light scatter*
- SST – Somatostatina (*somatostatin*)
- SSTR – Recetor da somatostatina (*somatostatin receptor*)
- SYN – Sinaptofisina (*synaptophysin*)
- TAC – Tomografia axial computadorizada
- TATE - (Tyr³)-octreotato
- TGF- β – Fator Transformador do Crescimento β (*transforming growth factor β*)
- TKI – Inibidor das tirosina cinases (*tyrosine-kinase inhibitor*)
- TNM - T- tamanho do tumor; N – invasão de gânglios linfáticos regionais; M - presença de metástases

TP53 – Proteína tumoral P53 (tumor *protein P53*)

Tyr – Tirosina (*tyrosine*)

UTR – *Untranslated region*

VC – Células viáveis (*viable cells*)

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor*)

VIP – Peptídeo vasoativo intestinal (*vasoactive intestinal peptide*)

vs – Versus

wt – Wild type

1. Introdução

1.1. Adenocarcinoma ductal pancreático

O termo “pâncreas” deriva do grego e é composto por duas palavras: *παν* (*pan*) significando tudo, e *κρέας* (*kreas*) significando carne. “Pancreas” significa assim “tudo carne”, reflectindo provavelmente dessa forma a textura uniforme do órgão. Não se tem a certeza de quem primeiro identificou o órgão e usou o termo “pâncreas” para se referir a ele. A sua identificação é no entanto, usualmente atribuída a Herófilo (Calcedónia, 335 a.c. – 280 a.c.), considerado o pai da anatomia (Ceranowicz et al., 2015).

O pâncreas é uma glândula alongada, com cerca de 15 a 25cm de comprimento, que se localiza no abdómen, retroperitonealmente, a nível do plano transpilórico, atrás do estômago, do qual se encontra separado pelo pequeno epiplon, entre o duodeno e o baço. Compreende a cabeça, processo uncinado, colo, corpo e cauda, que se encosta ao baço. É irrigado pelas artérias pancreaticoduodenais (superiores e inferiores) e pela esplénica. A drenagem venosa faz-se para o sistema porta (Ellis, 2013).

No adulto normal o pâncreas tem uma dupla composição: o componente exócrino, com unidades lobulares de ácinos que drenam para ductos de calibre progressivamente maior, que convergem no canal pancreático principal ou de Wirsung, e nos ductos pancreáticos acessórios ou de Santorini; e o componente endócrino, representado essencialmente pelos ilhéus de Langerhans (Ellis, 2013).

Trata-se assim de um órgão com dupla função, endócrina e exócrina, as quais interagem reciprocamente, cooperando para a digestão, a absorção e o metabolismo dos nutrientes ingeridos.

Os ilhéus de Langerhans são constituídos por células α , β , δ , ϵ , e PP ou F. Cada uma destas células tem uma especificidade e síntese própria, as células do tipo alfa produzem glucagon, as células do tipo beta produzem insulina e amilina, as células do

tipo delta produzem somatostatina (*SST, somatostatin*), as células do tipo épsilon produzem grelina, e as células do tipo PP ou F produzem o polipeptídeo pancreático (*PP, pancreatic polypeptide*) e adrenomedulina. Para além disso contém neuropeptídeos/co-transmissores que modulam a função exócrina do pâncreas (Pandiri, 2014).

Os ácinos produzem iões bicarbonato e enzimas digestivas (Ellis, 2013). A produção de enzimas pancreáticas é estimulada pela colecistoquinina, que é libertada pelas células I do duodeno quando gorduras e proteínas chegam a esta zona. No pâncreas são produzidas diversas enzimas, entre elas, a amílase, para digerir hidratos de carbono, a lípase para digerir lípidos, o tripsinogénio e o quimiotripsinogénio, como pró-enzimas que, em contato com a enteroquinase, produzida no duodeno, se transformam em tripsina e em quimiotripsina para digerir as proteínas, e as nucleases para digerir os ácidos nucleicos (Chandra and Liddle, 2014).

Graças à sua estrutura túbulo-acinosa, os ilhéus celulares endócrinos conseguem segregar as suas hormonas para o sistema porta insulo-acinar, regulando e condicionando, dessa forma, a atividade ductal e acinar das células exócrinas. Por outro lado, as células ductais e acinares afetam a fisiologia dos ilhéus de células endócrinas através da secreção de citocinas e de fatores de crescimento (Piciucchi et al., 2015).

O termo cancro do pâncreas engloba os tumores exócrinos e endócrinos do pâncreas, mas mais de 90% dos tumores pancreáticos originam-se no epitélio ductal, sendo como tal adenocarcinomas ductais pancreáticos (ADP) (Muniraj et al., 2013).

Apesar de ser uma doença rara, o cancro do pâncreas é uma das formas mais letais de cancro. A nível mundial a incidência de todos os tipos de cancro pancreático varia entre 1 a 10 casos por 100 000 pessoas, sendo geralmente maior nos países desenvolvidos e nos homens (Ryan et al., 2014). O cancro do pâncreas é, a nível

mundial, a oitava causa de morte por cancro em homens e a nona causa em mulheres (Ryan et al., 2014). Na União Europeia prevê-se que, em 2015 constitua, quer no homem, com cerca de 42 700 casos, quer na mulher, com 42 600 casos, a quarta principal causa de morte, no homem após o cancro do pulmão, do cólon e reto e da próstata e, na mulher, após os tumores da mama, do pulmão e do cólon e reto. A taxa de mortalidade por 100 000 mortes certificadas rondará, em 2015, os 8,15 no homem e os 5,62 na mulher. Segundo a base de dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre a mortalidade na União Europeia, em 2009 observaram-se 74 123 casos de morte por cancro do pâncreas, o que correspondeu a uma taxa de 6,6 mortes por 100 000 mortes certificadas e em 2015 prevê-se que este número suba para cerca de 85 300, o que corresponderá a uma taxa média de 6,9 mortes por 100 000 mortes certificadas (Malvezzi et al., 2015).

Nos Estados Unidos da América (EUA) prevêem-se para 2015, 48 960 novos casos de cancro do pâncreas (24 840 em homens e 24 120 em mulheres) e cerca de 40 560 mortes (20 710 em homens e 19 850 em mulheres), o que constitui, para ambos os sexos, cerca de 7% de todas as mortes previstas por cancro. Neste país, em 2015, este tumor constitui também a quarta causa de morte, quer no homem (após o cancro do pulmão e dos brônquios, da próstata e do cólon e reto) quer na mulher (após o cancro do pulmão e dos brônquios, da mama e do cólon e reto) (Siegel et al., 2015). Todavia espera-se que, em 2020, o cancro do pâncreas venha a constituir a segunda causa de morte (Garrido-Laguna and Hidalgo, 2015).

A taxa de sobrevivência para doentes com outras neoplasias gastrointestinais tem aumentado de forma expressiva nos últimos 30 anos, mas no cancro do pâncreas esse incremento não é tão notório (Muniraj et al., 2013). Por exemplo, nos EUA a taxa de sobrevivência relativa, para o cancro do pâncreas, 5 anos após o seu diagnóstico, tem vindo

a aumentar consideravelmente, mas continua a ser muito baixa, sendo de 3% no período compreendido entre 1995 e 1997 e de 7% no período compreendido entre 2004 e 2010 (Siegel et al., 2015).

O risco de alguém desenvolver cancro do pâncreas ao longo da vida é de 1,49% ou 1 em 67 pessoas, com a incidência, que é superior em homens, em afro-americanos e em grupos de baixo nível sócio-económico, a aumentar com a idade (Becker et al., 2014). A idade média de diagnóstico é, nos EUA, de 70 anos para os homens e de 76 anos para as mulheres (Eheman et al., 2012) Embora as causas do cancro do pâncreas sejam desconhecidas, vários fatores de risco foram identificados. Na Tabela 1 enunciam-se as síndromes genéticas e os fatores de risco associadas com o adenocarcinoma pancreático. Estima-se que cerca de 5 a 10% dos cancros do pâncreas tenham um componente hereditário (Klein et al., 2007). Em pessoas com história familiar conhecida de cancro do pâncreas num parente de 1º grau, o risco relativo de desenvolvimento do cancro do pâncreas, por comparação com a população em geral, é multiplicado por 2, por 6 ou por 30, se um, dois ou três membros da família se encontrarem afetados, respetivamente (Jacobs et al., 2010).

Tabela 1 - Síndromes genéticas e fatores de risco associados com o adenocarcinoma pancreático

Variável	Risco aproximado
Síndrome genética e gene (s) associado (s) - %	
Pancreatite hereditária (<i>PRSSI, SPINK1</i>)	50
Síndrome do melanoma e múltiplos nevos atípicos familiares (<i>p16</i>)	10 – 20
Síndrome do cancro do ovário e mama hereditários (<i>BRCA1, BRCA2, PALB2</i>)	1 – 2
Síndrome de Peutz-Jeghers (<i>STK11 [LKB1]</i>)	30 – 40
Cancro do cólon hereditário não polipósico (Síndrome de Lynch) (<i>MLH1, MSH2, MSH6</i>)	4
Ataxia telangiectasia (<i>ATM</i>)	Desconhecido
Síndrome de Li-Fraumeni (<i>P53</i>)	Desconhecido
Polipose adenomatosa familiar (<i>APC</i>)	4,5 – 6
Fibrose cística (<i>CFTR</i>)	3,5
Fator de risco	
Tabaco	2 – 3
Diabetes <i>mellitus</i> de longa evolução	2
Pancreatite crónica não hereditária	2 – 6
Obesidade, inatividade ou ambos	2
Grupo sanguíneo não 0	1 – 2

Adaptado de Ryan et al, 2014. O risco aproximado para os fatores de risco é expresso como risco relativo e para as síndromes genéticas como riscos de vida quando comparados com o risco na população em geral.

O mau prognóstico desta neoplasia resulta de vários fatores tais como a natureza silenciosa da doença, que leva ao diagnóstico tardio, o elevado potencial metastático e a resistência à quimioterapia e à radioterapia convencionais (Herrerros-Villanueva et al., 2012). A maior parte dos doentes são diagnosticados num estágio localmente avançado ou até mesmo com doença metastática (Bergmann et al., 2015).

Até ao momento, a única opção com hipóteses curativas é a resseção cirúrgica, mas ela só é viável se os doentes forem diagnosticados em estádios precoces, o que

ocorre em apenas 20% dos doentes com adenocarcinomas ductais pancreáticos, sendo a sobrevida média para os não operáveis da ordem dos 3,5 meses (Bilimoria et al., 2007).

Todavia, embora a cirurgia continue a ser o único tratamento curativo, esta estratégia terapêutica baseada na ressecção inicial não melhorou significativamente a sobrevida dos doentes nos últimos 25 anos, já que mais de 80% deles sofreram recidiva após ressecção (Garrido-Laguna and Hidalgo, 2015), sendo a taxa de sobrevida aos 5 anos de apenas 20 a 25% (Hackert et al., 2011).

Os restantes 80 % de doentes com adenocarcinomas ductais pancreáticos apresentam doença avançada no momento do diagnóstico, pelo que lhes restam as terapias paliativas como a quimioterapia e a radioterapia, apesar de estas não conferirem um grande aumento na sobrevida (Herreros-Villanueva et al., 2012).

Cerca de 60 a 70% dos tumores pancreáticos localizam-se na cabeça do pâncreas e cerca de 20 a 25% no corpo e na cauda. Os sinais e os sintomas de apresentação relacionam-se com a localização do tumor, sendo a icterícia uma manifestação comum dos tumores localizados na cabeça do pâncreas. De uma forma geral, os doentes com cancro do pâncreas apresentam-se com dor abdominal, perda de peso, astenia e anorexia e a diabetes está presente em cerca de 50% dos casos (Ryan et al., 2014).

Referindo-nos a todos os tumores pancreáticos, cerca de 90% são adenocarcinomas ductais. Os tumores neuroendócrinos e os carcinomas de células acinares representam cerca de 3 a 5% dos tumores pancreáticos e as neoplasias císticas menos de 1% (Rosewicz and Wiedenmann, 1997).

A Organização Mundial de Saúde (Bosman et al., 2010) classifica os tumores do pâncreas exócrino em três grupos principais, como se pode ver visualizado na Tabela 2, os tumores epiteliais (benignos, *borderline* e malignos), os tumores não epiteliais e os

tumores secundários, e inclui o adenocarcinoma ductal pancreático no grupo dos tumores epiteliais malignos.

Tabela 2 - Classificação histológica dos tumores do pâncreas exócrino (OMS, 2010)

Tumores epiteliais	Benignos	Cistoadenoma seroso		
		Cistoadenoma mucinoso		
		Adenoma mucinoso papilar intraductal		
		Teratoma maduro		
	Borderline	Neoplasia cística mucinosa com displasia moderada		
		Neoplasia mucinosa papilar intraductal com displasia moderada		
		Neoplasia pseudopapilar sólida		
	Malignos	Adenocarcinoma ductal	Carcinoma não cístico mucinoso	
			Carcinoma de células em anel de sinete	
			Carcinoma adenoescamoso	
			Carcinoma indiferenciado (anaplásico)	
			Carcinoma indiferenciado com células gigantes tipo osteoclasto	
			Carcinoma misto ductal-endócrino	
		Cistoadenocarcinoma seroso		
		Cistoadenocarcinoma mucinoso	Não invasivo	
			Invasivo	
		Carcinoma papilar mucinoso intraductal	Não invasivo	
			Invasivo (carcinoma papilar-mucinoso)	
		Carcinoma de células acinares	Cistoadenocarcinoma de células acinares	
			Carcinoma misto acinar-endócrino	
Pancreatoblastoma				
Carcinoma sólido pseudopapilar				
Outros				
Tumores não epiteliais				
Tumores secundários				

1.2. Lesões precursoras

A origem das células neoplásicas no adenocarcinoma ductal não é ainda clara, embora várias hipóteses já tenham sido propostas, como o epitélio ductal, as células dos ilhéus pancreáticos e, mais recentemente, as células estaminais pancreáticas (Chakraborty et al., 2011; Murtaugh and Leach, 2007).

Estudos genéticos sugerem que o adenocarcinoma ductal pancreático se desenvolve a partir de uma de três tipos de lesões precursoras tais como as neoplasias intraepiteliais pancreáticas (*PanIN*, *pancreatic intraepithelial neoplasia*), as neoplasias mucinosas papilares intraductais (*IPMN*, *intraductal papillary mucinous neoplasm*) e as neoplasias císticas mucinosas (*MCN*, *mucinous cystic neoplasm*), apesar de a maioria ter origem nas lesões do tipo PanIN (Dudeja and Allen, 2015).

As lesões do tipo PanIN (Tabela 3) são não invasivas, não ultrapassam a membrana basal e subdividem-se em PanIN-1A (plana), PanIN-1B (papilar sem displasia), PanIN-2 (papilar com alterações displásicas) e PanIN-3 (*carcinoma in situ*) (Hruban et al., 2007).

Tabela 3 - Classificação histológica das lesões precursoras do adenocarcinoma ductal pancreático

Lesões do tipo PanIN	Lesões do tipo IPMN	Lesões do tipo MCN
PanIN-1A (plana)	Tipo gástrico (atipia ligeira)	Cistoadenoma mucinoso
PanIN-1B (papilar sem displasia)	Tipo intestinal (atipia moderada a severa)	Cistoadenoma mucinoso <i>borderline</i>
PanIN-2 (papilar com displasia)	Tipo pancreatobiliar (atipia severa)	Cistoadenocarcinoma mucinoso não invasivo (<i>carcinoma in situ</i>)
PanIN-3 (<i>carcinoma in situ</i>)	Tipo oncocítico (atipia severa)	

Adaptado de Takaori, 2007

A lesão do tipo PanIN é uma lesão microscópica, inferior a 5mm, plana ou papilar, que se desenvolve nos ductos pancreáticos intralobulares. As lesões do tipo PanINs são compostas por células colunares ou cubóides, com diferentes quantidades de

mucina, e vários graus de atipia citológica e arquitetural. As lesões do tipo PanIN-1A e do tipo PanIN-1B são lesões de baixo grau com atipia mínima. A lesão do tipo PanIN-2 demonstra atipia (pleomorfismo nuclear, apinhamento nuclear e hiperchromasia nuclear) ligeira a moderada e a lesão do tipo PanIN-3 é caracterizada por atipia severa sendo, por isso, também designada como “*carcinoma in situ*”. Tem habitualmente uma morfologia papilar mas também pode apresentar-se como plana ou cribiforme (Distler et al., 2014).

Crê-se que a carcinogénese pancreática progride das lesões do tipo PanIN de baixo grau de displasia para as lesões do tipo PanIN de alto grau e posteriormente para cancro invasivo num processo acompanhado, paralelamente, por alterações genéticas, como o encurtamento de telómeros, a hipermetilação dos ilhéus CpG, a sobreexpressão das apomucinas 5AC e 1, e a mutação nos genes *KRAS*, *P16/CDKN2*, *TP53* e *SMAD4/DPC4* (Real, 2003).

Para além das lesões do tipo PanIN, existem as lesões do tipo IPMN. Estas são neoplasias produtoras de mucina, que se manifestam por uma grande dilatação dos ductos intra-pancreáticos e que envolvem todo o sistema de ductos ou, em alternativa, estão restritas ao ducto pancreático principal ou aos seus ramos. As lesões do tipo IPMN são classificadas histologicamente em vários subtipos, uns localizados ao ducto principal, como sucede com os subtipos intestinal, pancreatobiliar e oncocítico e outro, o gástrico, localizado às suas ramificações. O subtipo gástrico corresponde a atipia epitelial ligeira, o subtipo intestinal que corresponde a atipia epitelial moderada a severa, o subtipo pancreatobiliar que corresponde a atipia epitelial severa, e o subtipo oncocítico que corresponde a atipia epitelial severa. O subtipo pancreatobiliar apresenta papilas com ramificações complexas e finas, citoplasma moderadamente anfófilo (entre eosinófilo e basófilo) e núcleos hiperchromáticos aumentados, enquanto o subtipo oncocítico apresenta papilas com ramificações complexas, mas espessas, com “lúmen”

intracelular e intraepitelial, citoplasma abundante e eosinofílico (oncocítico), núcleos grandes e redondos, com nucléolos proeminentes (Furukawa et al., 2005). Devemos no entanto referir que estes dois últimos subtipos são raros. As lesões do tipo IPMN do tipo intestinal têm propensão para se transformarem em carcinoma mucinoso não-cístico, colóide, com reservatórios extracelulares abundantes de mucina e epitélio neoplásico flutuante (Distler et al., 2014), enquanto as lesões do tipo IPMN que estão nos ramos acessórios são geralmente do tipo gástrico e, normalmente, benignas. As lesões do tipo IPMN pancreatobiliares têm um risco mais elevado de progredirem para o adenocarcinoma ductal pancreático. Apesar desta classificação, muitas vezes as lesões do tipo IPMN são constituídas por mais do que um subtipo histológico (Takaori, 2007).

As lesões correspondentes a neoplasias císticas mucinosas (MCN) distinguem-se das lesões do tipo IPMN pela ausência de comunicação entre o cisto e o ducto pancreático adjacente. As neoplasias císticas mucinosas caracterizam-se pela presença de estroma do tipo ovárico e classificam-se histologicamente em cistadenoma mucinoso, cistadenoma mucinoso com displasia moderada (*borderline*) e cistadenocarcinoma mucinoso não invasivo (*carcinoma in situ*). Todas as neoplasias císticas mucinosas são consideradas geralmente como potencialmente malignas, devido ao risco associado de cistadenocarcinoma mucinoso invasivo (Brugge, 2015).

1.3. Estadiamento

O estadiamento do cancro do pâncreas exócrino é importante para estabelecer o prognóstico e o regime terapêutico a adotar para o tratamento da lesão. Atualmente, o estadiamento deste tipo de neoplasia faz-se de acordo com a mais recente edição (a sétima) da classificação TNM para tumores malignos do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) onde o T traduz o tamanho do tumor, o N traduz a invasão de gânglios

linfáticos regionais e o M traduz a presença ou não de metástases (Tabela 4) (Edge et al., 2010).

Tabela 4 - Estadiamento TMN para o adenocarcinoma ductal pancreático (AJCC)

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

Adaptado de (Edge et al., 2010).

Para podermos estabelecer uma comparação apresentamos também a classificação TNM da OMS (2010) (Bosman et al., 2010).

Tabela 5 - Classificação TNM dos tumores do pâncreas exócrino (OMS, 2004)

Tumor primário (T)	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor limitado ao pâncreas, 2cm ou menos na sua maior dimensão
T2	Tumor limitado ao pâncreas, com mais de 2cm na sua maior dimensão
T3	O tumor prolonga-se para uma das seguintes direções: duodeno, ducto biliar, tecidos peripancreáticos
T4	O tumor prolonga-se para uma das seguintes direções: estômago, baço, cólon, vasos adjacentes de grande calibre
Nódulos linfáticos regionais (N)	
Nx	Os nódulos linfáticos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástases nos nódulos linfáticos regionais
N1	Metástases nos nódulos linfáticos regionais; N1 ₀ , com metástases num único nódulo regional; N1 _b , com metástases em múltiplos nódulos linfáticos regionais
Metástases à distância (M)	
Mx	As metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância
Agrupamento por estádios	
Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0 ou T2 N0 M0
Estádio II	T3 N0 M0
Estádio III	T1 N1 M0 ou T2 N1 M0 ou T3 N1 M0
Estádio IVA	T4 Qualquer N M0
Estádio IVB	Qualquer T Qualquer N M1

O rastreio do cancro do pâncreas não é aconselhável para a população em geral, mas sim para indivíduos de alto risco como, por exemplo, os indivíduos com “cancro do pâncreas familiar” e com síndromes genéticas específicas (Peutz-Jeghers, *PI6*, *BRCA*, *PALB* e portadores de mutações nos genes reparadores do ADN) por forma a conseguirem detetar-se adenocarcinomas ductais pancreáticos ressecáveis, neoplasias mucinosas papilares intraductais com displasia de alto grau ou neoplasias pancreáticas intraepiteliais avançadas. Quer a imagem por ressonância magnética nuclear quer a ecoendoscopia são utilizadas neste rastreio com taxas de deteção que rondam os 20 e os

14%, respetivamente, todavia só cerca de 2% destas lesões são ressecáveis no momento do diagnóstico não existindo evidência de que a ressecção precoce de lesões benignas ou de baixo grau melhore a sobrevivência (Capurso et al., 2015).

1.4. Genética

Quer os oncogenes, quer os genes supressores tumorais, contribuem para a gênese dos tumores pancreáticos. No interior das células pancreáticas, a acumulação de alterações genéticas conduz a um processo multifaseado que culmina na malignidade (Deer et al., 2010).

Os cancros do pâncreas acumulam múltiplas alterações genéticas, associadas com a desregulação do ciclo celular, a inibição da apoptose, a invasão, a metastização e a má resposta ao tratamento, que incluem mutações frequentes no proto-oncogene *KRAS* (do inglês *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*) e nos genes supressores tumorais *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), também conhecido como *P16* ou *P16INK4a*, no *TP53* (*tumor protein P53*), codificante da proteína P53, e no *SMAD4* (membro 4 da família *SMAD*, também conhecido como *DPC4* (*deleted in pancreatic carcinoma locus 4*)). As *SMAD* são um conjunto de mediadores intracelulares que são ativados pelos sinais extracelulares do fator transformador de crescimento β (*TGF- β* , *transforming growth factor- β*), deslocando-se do citoplasma para o núcleo de onde passam a controlar a transcrição génica (Brosens et al., 2015).

As mutações no proto-oncogene *KRAS* ocorrem em quase todos os tumores primários do pâncreas e estão presentes precocemente na progressão da doença maligna pancreática. Os membros da família RAS (H-, K- e N-RAS) são proteínas ligantes de nucleótidos de guanina que transmitem sinais a partir dos recetores de superfície das células. Mutações nos codões 12, 13 ou 61 inibem a atividade *GTP* (guanósina trifosfato) *ase* do *RAS*, conduzindo a uma proteína oncongénica RAS constitutivamente

ativada no estado GDP (guanosina difosfato) -ligado ativo, que induz múltiplas vias de sinalização, como por exemplo a via Raf (proteína cinase)-*MAPK/ERK* (*mitogen-activated protein kinase*) originalmente designada por *ERK* (*extracellular signal-regulated kinase*) e a via Akt/proteína cinase B (Deer et al., 2010). No *KRAS*, as mutações *missense* em *hotspots* específicos, como por exemplo o codão 12, ocorrem em cerca de 90% dos adenocarcinomas (Wood and Hruban, 2015).

A inativação do gene supressor tumoral *CDKN2A/P16* é também um evento precoce, presente em cerca de 40% das lesões do topo PanIN (Deer et al., 2010). A via do *CDKN2A/P16*, que codifica um regulador crítico do ciclo celular, encontra-se inativado em mais de 90% dos adenocarcinomas pancreáticos por vários mecanismos, que incluem a mutação intragénica associada a perda de heterozigotia, de deleção homozigótica e de metilação do promotor (Dunne and Hezel, 2015).

As mutações no gene supressor tumoral *TP53*, um componente chave na resposta celular ao stresse, ocorrem mais tardiamente, em cerca de 75% dos adenocarcinomas pancreáticos, mais frequentemente por mutação intragénica associada a perda de heterozigotia. As mutações neste gene resultam na expressão nuclear intensa e difusa da proteína P53, que pode ser detetada por imunohistoquímica (Frank et al., 2015).

Como já referimos, o *TP53* e o *CDKN2A/P16* desempenham um papel importante no ponto de controlo do ciclo celular na fase G1/S e na manutenção da integridade do genoma após lesão do ADN (Deer et al., 2010).

O *SMAD4/DPC4* é um membro do *TGF- β* e também um supressor tumoral que se encontra inativado em cerca de 55% dos adenocarcinomas pancreáticos invasivos, geralmente por deleção homozigótica ou por mutação intragénica associada a perda de heterozigotia (Wood and Hruban, 2015). Esta inativação somática ocorre tardiamente na progressão para tumor invasivo e surge geralmente quando também estão presentes

alterações nos três genes anteriores de que falámos (Deer et al., 2010). Estas mutações podem também ser detetadas por imunohistoquímica uma vez que ocorre perda de expressão proteica nas células malignas, mas ela permanece em células endoteliais e estromais não neoplásicas. As mutações neste gene estão associadas com pior prognóstico e com metástases à distância (Dunne and Hezel, 2015).

Apesar de estes quatro genes serem os mais mutados no cancro do pâncreas só cerca de 37% dos doentes têm mutações nos quatro genes, reforçando o carácter genético heterogéneo da doença (Wood and Hruban, 2015).

Os microssatélites são sequências curtas e repetitivas de ADN com 1 a 6 pares de bases e que se localizam em regiões não codificantes do genoma. As repetições podem ser de um, dois, três ou mais pares de bases. Erros de replicação podem conduzir a indesejáveis inserções ou deleções nestas regiões de microssatélites, que são detetadas pelos genes de reparação do ADN (*MMR, mismatch repair*) (Williams and Huang, 2013). A instabilidade dos microssatélites (*MSI, microsatellite instability*) é uma característica genética dos cancros familiares e esporádicos com várias localizações e está relacionada com mau funcionamento das proteínas MMR (Laghi et al., 2012). Esta instabilidade dos microssatélites tem sido descrita no cancro do pâncreas, e alguns estudos sugerem que possa estar associada às mutações do gene *KRAS* (Brentnall et al., 1995). Em relação à instabilidade dos microssatélites, os tumores podem ser divididos em MSI-high (MSI-H) quando apresentam duas ou mais mutações no painel de marcadores utilizado para pesquisa, e em MSI-low (MSI-L) se existe apenas um marcador mutado no painel de marcadores (Murphy et al., 2006). Num estudo realizado com um painel de cinco repetições de mononucleótidos (BAT25, BAT26, NR-21, NR-24 e NR-27) em 338 adenocarcinomas ductais pancreáticos ressecados, concluiu-se que a prevalência de instabilidade dos microssatélites não era significativa (Laghi et al.,

2012). Outras investigações propõem que os tumores pancreáticos com instabilidade dos microssatélites possam ter um melhor prognóstico após resseção devido à intensa reação imunológica ao tumor (Nakata et al., 2002).

O sistema de reparação do ADN, MMR, é uma das vias de reparação mais bem conservadas desde a bactéria ao ser humano. O sistema MMR corrige inserções e deleções resultantes de erros da ADN polimerase durante o processo de replicação. Nos seres humanos há dois grupos de enzimas de reparação, o MutS que engloba os genes *MSH2*, *MSH3* e *MSH6* e o MutL, que engloba os genes *MLH1*, *MLH3*, *PMS1* e *PMS2* (Muro et al., 2015).

A síndrome de Lynch, com uma incidência que varia de 1:660 a 1:2 000 (de la Chapelle, 2005) é a forma mais comum de cancro colo-retal hereditário e está habitualmente associada a um risco aumentado de cancro em múltiplas outras localizações, tais como no endométrio, no ovário, no estômago, no intestino delgado, no trato urinário, no cérebro, no pâncreas e nas glândulas sebáceas cutâneas (Kastrinos and Stoffel, 2014). O risco de tumor pancreático está 8,6 vezes aumentado nos doentes com a síndrome de Lynch, em relação à população em geral (Kastrinos et al., 2009). Estes tumores pancreáticos têm geralmente uma aparência medular com abundante infiltração linfocítica e instabilidade dos microssatélites (Grover and Syngal, 2010). Em doentes com esta síndrome, existem anomalias nos genes MMR, geralmente *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2* e *EPCAM* (Kastrinos and Stoffel, 2014). Foi encontrada uma mutação *MLH1* c.2252_2253delAA associada ao risco aumentado de tumores pancreáticos (Borelli et al., 2014) e outra no gene *MSH2* associada a uma neoplasia pancreática mucinosa papilar intraductal (Flanagan et al., 2015).

1.5. Células estaminais

Apesar de a origem da potencial célula inicial do cancro do pâncreas permanecer por esclarecer, no interior dos tumores hematopoiéticos e dos tumores sólidos, foram identificadas subpopulações *minor* de células com capacidade de autorrenovação, também designadas por células estaminais do cancro (*CSC, cancer stem cells*), que parecem ser responsáveis pela iniciação, pelo crescimento, pela metastização e pela resistência do tumor às terapias convencionais (Fitzgerald and McCubrey, 2014). A teoria das células estaminais do cancro defende que a capacidade de um tumor crescer e se propagar está dependente de um subconjunto de pequenas células, as células estaminais do cancro, e sugere que para se conseguir eliminar um tumor e prevenir a sua recorrência todas estas células estaminais do cancro têm de ser eliminadas (Lee et al., 2008).

Não é claro se as células estaminais do cancro pancreático derivam de uma célula estaminal mutada, ou de um progenitor “a jusante”, também designadas por células amplificadoras “em trânsito”, que desenvolveram a capacidade de autorrenovação desregulada, ou da desdiferenciação de uma célula diferenciada que, devido a acumulação de alterações genéticas, voltou a obter características de célula estaminal (Dorado et al., 2011).

As células estaminais do cancro não representam uma população homogénea. Foram identificadas diferentes subpopulações no adenocarcinoma ductal do pâncreas (Li et al., 2007), com base no uso combinado de marcadores de superfície, tais como o CD24, o CD44, a molécula de adesão ao epitélio celular (*EpCAM, epithelial cell adhesion molecule*) também conhecida como antigénio de superfície da célula epitelial (*ESA, epithelial cell surface antigen*), o CD133, o CD326 e outros como as células *SP (side population)* com sobreexpressão dos transportadores ABCG2 (*ATP-binding*

cassette sub-family G member 2) e do CXCR4 (*C-X-C, chemokine receptor type 4*). Estes marcadores permitem o isolamento das células estaminais do cancro, a sua caracterização e a sua propagação (Zhu and Yuan, 2015).

1.6. Transição epitelial-mesenquimal

A propagação das células estaminais do cancro pode depender da existência de um fenótipo de transição epitelial-mesenquimal (*EMT, epithelial-mesenchymal transition*), um processo de desenvolvimento primordial pelo qual as células epiteliais adultas e polarizadas sofrem alterações bioquímicas e podem assumir um fenótipo mesenquimal adquirindo, dessa forma, capacidade migratória, de invasividade, de resistência à apoptose e de expressão de componentes da matriz extracelular (Kalluri and Weinberg, 2009; Zhan et al., 2015). Este processo de desdiferenciação está associado à perda de marcadores funcionais das células epiteliais, como a E-caderina e ao aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina. A perda de adesão celular, com o desaparecimento das junções intercelulares, e a alteração do fenótipo de uma morfologia epitelial para outra do tipo fibroblasto, mais móvel, característica da EMT, desempenha um papel importante na quimiorresistência e na progressão do cancro (Arumugam et al., 2009a).

A mobilidade celular tem, efetivamente, um papel importante na quimiotaxia, no desenvolvimento embrionário, no crescimento invasivo e na formação de metástases (Giebel et al., 2004).

Também tem sido demonstrado no cancro pancreático, que o fenótipo EMT se correlaciona com as células fenotipicamente $CD24^+CD44^+CD133^+$, capacitando dessa forma as células estaminais do cancro pancreáticas com forte poder migratório, enquanto mantêm a sua capacidade estaminal, o que permite a produção de outras células estaminais do cancro durante o processo de metastização (Zhang et al., 2012).

A proteína CD133 desempenha um importante papel na migração e na invasão, facilitando a transição epitelial-mesenquimatosa. Esta proteína parece estar relacionada com a arquitetura tecidual e com a polaridade celular, características necessárias à movimentação das células (Ding et al., 2012).

Uma análise do *KRAS* nas linhas celulares A549, H23, SW1573, H460, SK-LU-1, H727, H441, H2009, H358, PANC-1, PA-TU-8988T, SW1990, PA-TU-8902, YAPC, Capan-1 e HPAF-II, revelou duas modalidades de expressão, isto é, linhas celulares que necessitavam da mutação do *KRAS* (*KRAS*-dependentes) para manter a viabilidade e outras linhas celulares que não necessitavam (*KRAS*-independentes) (Singh et al., 2009).

As linhas celulares dependentes da mutação do *KRAS* estavam associadas a um fenótipo epitelial bem diferenciado, e aquelas que eram independentes dessa mutação, como por exemplo a linha PANC-1, apresentavam características associadas com a transição epitelial-mesenquimatosa (Wang et al., 2009).

Também as células tumorais pancreáticas resistentes à gemcitabina têm uma maior capacidade migratória invasiva do que as não são resistentes a este fármaco. As células resistentes apresentam-se como fibroblastos transformados, fusiformes, com pseudópodes e adesão reduzida e características de transição epitelial-mesenquimatosa, que se traduz por um aumento da expressão da vimentina, uma redução da expressão da E-caderina e localização nuclear da β catenina (Shah et al. 2007).

Em localizações secundárias, isto é, em metástases, as células mesenquimatosas podem coalescer e polarizar-se, iniciando um processo inverso designado por transição mesenquimatosa-epitelial (*MET*, *mesenchymal to epithelial transition*) com formação de células epiteliais “secundárias” (Brabletz, 2012). O microambiente da localização secundária tem uma influência importante nesta transformação, daí que as metastizações se localizem em órgãos específicos (Thyri et al. 2012, Zhou et al., 2005).

1.7. Diferenciação neuroendócrina

Os adenocarcinomas ductais pancreáticos podem apresentar, de forma disseminada, células neuroendócrinas. A incidência relativa, a histogênese, a produção hormonal e as implicações prognósticas da sua presença são controversas (Linder et al., 2006). Esta diferenciação neuroendócrina-like (*NED, neuroendocrine differentiation*) dos carcinomas pancreáticos, tem sido relatada em vários estudos, e também em outros tumores como os do pulmão, da mama, do estômago, do fígado, do cólon e da próstata (Tezel et al., 2000). Tem sido defendido que células ductais, com transformação neoplásica, imaturas, podem passar por uma diferenciação neuroendócrina durante o crescimento tumoral (Linder et al., 2006). Anticorpos contra a molécula de adesão da célula neuronal (*NCAM, neural cell adhesion molecule*) ou CD56, a enolase neuroespecífica (*NSE, neuron-specific enolase*), a sinaptofisina, o CD57 e a cromogranina A (*CGA, chromogranin A*) podem ser usados na identificação por coloração imunohistoquímica dos adenocarcinomas ductais pancreáticos com diferenciação neuroendócrina (Tezel et al., 2000). O marcador ductal CK19 tem um papel importante na confirmação da origem epitelial dessas células neuroendócrinas, aparentemente menos agressivas e com menor capacidade metastática (Tezel et al. 2002).

1.8. Tratamento do adenocarcinoma pancreático ductal

Como dissemos atrás, o diagnóstico do adenocarcinoma pancreático ductal é habitualmente tardio, apresentando-se cerca de 50 a 60% dos doentes, com doença metastática, tendo como única opção de tratamento a quimioterapia paliativa (Shrikhande et al., 2007). Mesmo aqueles, em que os cancros são operáveis, devido à alta taxa de recidiva requerem quimioterapia adjuvante, a qual assegura, nestas situações, taxas de sobrevida aos 5 anos de 15 a 25% (Loos et al., 2008).

O tratamento do cancro do pâncreas ressecável, na generalidade dos doentes, passa pela quimioterapia ou pela radioterapia ou por uma combinação de ambas antes (terapia neoadjuvante) ou após (terapia adjuvante) a resseção cirúrgica (Herrerros-Villanueva et al., 2012).

No que se refere à quimioterapia, vários fármacos têm sido utilizados. O primeiro, desde 1950, foi o 5-fluorouracilo (5-FU), um inibidor da sintetase do timidilato que bloqueia a síntese das timidinas pirimidinas, um nucleótido essencial à replicação do ADN. Confere um benefício de sobrevida (*survival benefit*) de seis meses (Neoptolemos et al., 2009) quando administrado como terapia adjuvante em doentes com adenocarcinoma pancreático ressecável. A sua combinação com doxorrubicina ou com mitomicina, ou com doxorrubicina e cisplatina, ou combinada e sequencial com ciclofosfamida, metotrexato, vincristina e mitomicina C, não trouxe benefícios (Cullinan et al., 1990). Só a combinação com leucovorina, irinotecam e oxiplatina (FOLFIRINOX) mostrou (Conroy et al., 2011), nos doentes com metástases, uma taxa de resposta objetiva (*OR, objective response*), que pode ser uma resposta completa (*CR, complete response*) ou uma resposta parcial (*PR, partial response*) e significativa, com uma sobrevida global (*OS, overall survival*), de 11,1 meses vs. 6,8 meses e uma sobrevida livre de progressão (*PFS, progression-free survival*) de 6,4 vs. 3,3 meses) em comparação com a gemcitabina em monoterapia. Embora com mais efeitos tóxicos, aquela associação é a opção atual para os doentes com bom estado geral e níveis normais de bilirrubina (Ghosn et al., 2007; Gourgou-Bourgade et al., 2013). Novas fluoropirimidinas têm sido desenvolvidas e a S-1 assume-se como alternativa aos doentes refratários à gemcitabina (Kimura et al., 2012).

A capecitabina é uma fluoropirimidina administrada por via oral que, após absorção intestinal, é convertida em 5-FU por três enzimas presentes no fígado e nos

tumores (Schuller et al., 2000). O seu uso em monoterapia não apresenta vantagens em relação à gemcitabina (Cartwright et al., 2002).

A gemcitabina foi o primeiro fármaco a demonstrar-se superior ao 5-FU, em termos de sobrevida global (5,7 meses vs. 4,4 meses) e na sobrevida livre de progressão a 1 ano (18% vs. 2%) (Burriss et al., 1997). É um análogo nucleosídeo da fase S, um difluorinado da desoxicidina. É fosforilada, por enzimas citoplasmáticas e mitocondriais, nos seus metabolitos ativos, a gemcitabina di- e trifosfato que, de forma combinada, inibem a síntese do ADN (Huang et al., 1991). Constitui a terapia de primeira linha para o cancro do pâncreas metastizado (Teague et al., 2015). Devido aos bons resultados obtidos em monoterapia fizeram-se tentativas de associação da gemcitabina com outros citostáticos tais como o 5-FU, a capecitabina, a cisplastina, a oxiplatina, o irinotecam ou o docetaxel (Herreros-Villanueva et al., 2012). A associação com a gemcitabina não demonstrou melhoria significativa na mediana da sobrevida global ou na mediana da sobrevida livre de progressão (Berlin et al., 2002; Di Costanzo et al., 2005). A associação de gemcitabina com capecitabina demonstrou uma melhoria significativa da sobrevida global (7,1 vs. 6,2 meses) e na sobrevida livre de progressão a 1 ano (13,9% vs. 8,4%), por comparação com a gemcitabina isolada (Bernhard et al., 2008; Cunningham et al., 2009; Herrmann et al., 2007), pelo que representa uma boa opção para o cancro do pâncreas localmente avançado ou metastizado (Teague et al., 2015). A platina forma aductos com o ADN inibindo a transcrição e a replicação provocando, dessa forma, morte celular (van Moorsel et al., 1999). A oxiplatina é um análogo de terceira geração da platina e que pode ter atividade em tumores resistentes à cisplatina ou à carboplatina. A gemcitabina melhora a formação desses aductos e a platina aumenta a incorporação do trifosfato de gemcitabina no ADN. Apesar desta ação sinérgica os ensaios clínicos não demonstraram melhoria da sobrevida (Colucci et al.,

2010; Heinemann et al., 2006). Todavia, uma meta-análise com 5 ensaios clínicos randomizados demonstrou um benefício evidente na sobrevida (Rougier et al., 2013), pelo que esta associação está recomendada pela National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para os estádios avançados de cancro do pâncreas hereditário. Porém, em pacientes com história familiar de cancro da mama, cancro do ovário ou cancro pancreático foi demonstrada uma melhoria da mediana da sobrevida global nos doentes que faziam um regime terapêutico baseado na cisplatina (Lowery et al., 2011). O irinotecano é um inibidor das topoisomerasas com pouca atividade nos doentes com cancro do pâncreas avançado e a sua associação com gemcitabina não é recomendada (Stathopoulos et al., 2006). Os taxanos incluem o paclitaxel e o docetaxel que atuam provocando a estabilização dos microtúbulos, parando dessa forma o ciclo celular. Simultaneamente aumentam a sensibilidade à radiação. Os ensaios clínicos realizados têm demonstrado boas taxas de resposta mas ainda não se completou um estudo de fase III (Jacobs et al., 2004; Lutz et al., 2005).

A associação de gemcitabina e *nab* (*nanoparticle albumin-bound*)-paclitaxel é o tratamento de primeira linha mais recente, aprovado para o tratamento do cancro pancreático metastizado. Trata-se da recurso à nanotecnologia para ligar albumina humana ao paclitaxel, o que aumenta a biodisponibilidade do fármaco e lhe permite atravessar o denso estroma do adenocarcinoma pancreático (Li et al., 2012). Num ensaio clínico de fase II em que se comparou a associação de gemcitabina com nab-paclitaxel vs. gemcitabina isolada, verificaram-se aumentos significativos da sobrevida global (8,5 vs. 6 meses) e da sobrevida livre de progressão (5,5 vs. 3,7 meses) embora com maior mielossupressão e neuropatia periférica (Von Hoff et al., 2013).

Em resumo, num doente com cancro do pâncreas localmente avançado ou metastizado oferecem-se várias alternativas de terapia inicial. Para o caso de doentes

com cancro pancreático localmente avançado temos a gemcitabina isolada ou a associação de gemcitabina com capecitabina, enquanto para os doentes com metástases temos a gemcitabina isolada, a associação de gemcitabina com capecitabina, a associação FOLFIRINOX ou a associação de gemcitabina com nab-paclitaxel.

Nos doentes que falham a primeira linha de tratamento, a terapia com 5-FU está recomendada, bem como a associação de oxiplatina com 5-FU ou de oxiplatina com gemcitabina, irinotecan ou capecitabina (Cantore et al., 2004; Demols et al., 2006; Saif, 2009).

Para além da quimioterapia outras terapias sistémicas têm sido tentadas, em especial as dirigidas a alvos moleculares, com os genes mutados ou sobreexpressos no cancro do pâncreas, como por exemplo o recetor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*, *epidermic growth factor receptor*), o recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico (*HER2*, *human epidermal growth factor receptor type 2*) e o fator de crescimento do endotélio vascular (*VEGF*, *vascular endothelial growth factor*) (Teague et al., 2015).

No que se refere ao EGFR, que se apresenta sobreexpresso no cancro do pâncreas, foram usados anticorpos monoclonais (cetuximab) ou inibidores da tirosina cinase dirigidos ao domínio tirosina cinase do EGFR. Destes, só a associação gemcitabina e erlotinib, um inibidor da tirosina cinase, tem tido resultados promissores (Safran et al., 2004). Os tumores pancreáticos com mutação do *KRAS* requerem a integridade da via de sinalização ativada pelo EGFR (ativação das vias *RAS/RAF/MEK*, *PIK3/AKT* e *JAK/STAT*) pelo que a sua inibição pode representar uma alternativa terapêutica importante. Todavia, na terapia dirigida ao HER2 com o anticorpo monoclonal trastuzumab associado à gemcitabina ou na terapia dirigida ao VEGF com o anticorpo

monoclonal bevacizumab associada à gemcitabina, os resultados não têm sido promissores (Ko et al., 2012).

O uso da radiação como terapia neoadjuvante isolada ou adjuvante, associada à quimioterapia, ou ainda a nível intraoperatório têm constituído alternativas viáveis em doentes com tumor localizado (Gutt et al., 2009; Stessin et al., 2008; Varadhachary et al., 2006). A quimiorradioterapia que associa a radiação ao 5-FU, este como radiosensibilizante, tem demonstrado uma melhoria da sobrevida em doentes com tumores não ressecáveis localmente avançados (Moertel et al., 1981).

1.9. Tumores neuroendócrinos do pâncreas, classificação e tratamento

Os tumores neuroendócrinos (NETs) constituem um grupo diversificado de neoplasias que têm a sua origem em células neuroendócrinas, com origem embrionária comum na crista neural, e que se dispersam por diferentes órgãos como, por exemplo, o tubo digestivo, o pâncreas e o pulmão (McKenna and Edil, 2014).

Trata-se de tumores que se comportam como órgãos endócrinos capazes, por isso, de sintetizar e secretar neurohormonas e peptídeos com ação fisiológica (Fraenkel et al., 2012).

Os tumores neuroendócrinos do tubo digestivo e do pâncreas, também assumem a designação de tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos (*GEP-NETs*, *gastroenteropancreatic-neuroendocrine tumors*) (McKenna and Edil, 2014).

Os tumores neuroendócrinos do pâncreas são raros (pNETs, *pancreatic neuroendocrine tumors*), constituindo cerca de 1 a 2% das neoplasias pancreáticas e cerca de 7% de todos os tumores neuroendócrinos (Lawrence et al., 2011; Oberg, 2010). Apresentam uma incidência de 0,43 por 100 000 pessoas, mas esta incidência mais que duplicou nos últimos 30 anos (Fraenkel et al., 2012; Lawrence et al., 2011), o que se explica pela melhor perceção da sua existência pelos clínicos e também devido à

evolução das técnicas de diagnóstico imagiológico, particularmente da tomografia axial computadorizada (TAC) e da ecoendoscopia. Os resultados sobre a prevalência obtida por estudos de autópsias, ronda os 0,8% a 10% (Halfdanarson et al., 2008b), existindo uma ligeira predominância nos homens (55% vs. 45% nas mulheres), na raça caucasiana (84% vs. 16%) e a idade média de apresentação ronda os 55 anos para os tumores funcionais e os 59 anos para os tumores não funcionais (Halfdanarson et al., 2008a).

A OMS, (DeLellis et al., 2004) classificava (Tabela 6) inicialmente os tumores do pâncreas endócrino em tumores benignos endócrinos bem diferenciados (funcionantes e não funcionantes), tumores malignos endócrinos bem diferenciados (funcionantes e não funcionantes), carcinoma de pequenas células ou carcinoma endócrino pouco diferenciado, e carcinoma misto exócrino-endócrino.

Tabela 6 - Classificação histológica dos tumores do pâncreas endócrino (OMS, 2004)

<p>Tumores benignos endócrinos bem diferenciados</p> <p>Funcionantes</p> <p>Produtores de insulina (insulinomas)</p> <p>Produtores de glucagon (glucagonomas)</p> <p>Produtores de somatostatina (somatostatina)</p> <p>Produtores de gastrina (gastrinoma)</p> <p>Podutores de peptídeo vasoativo intestinal (<i>VIP, vasoactive intestinal peptide</i>) (VIPoma)</p> <p>Outros</p> <p>Não funcionantes (<i>borderline</i> ou de comportamento incerto)</p> <p>Microadenoma (<0,5 cm)</p> <p>Outros</p>
<p>Tumores malignos endócrinos bem diferenciados</p> <p>Funcionantes</p> <p>Produtores de insulina (insulinomas)</p> <p>Produtores de glucagon (glucagonomas)</p> <p>Produtores de somatostatina (somatostatina)</p> <p>Produtores de gastrina (gastrinoma)</p> <p>Podutores de peptídeo vasoativo intestinal (<i>VIP, vasoactive intestinal peptide</i>) (VIPoma)</p> <p>Outros</p> <p>Não funcionantes</p>
<p>Carcinoma endócrino pouco diferenciado – carcinoma de pequenas células</p>
<p>Carcinoma misto exócrino-endócrino</p>

Todavia, em 2010, a OMS (Bosman et al., 2010) alterou esta sistemática, passando a classificar os tumores digestivos neuroendócrinos em tumores neuroendócrinos de grau 1, tumores neuroendócrinos de grau 2, e carcinomas neuroendócrinos (grau 3), sendo estes subdivididos em carcinomas de grandes e de pequenas células. A classificação adapta-se assim à já existente para os tumores pulmonares neuroendócrinos. Os conceitos de benigno e de maligno desaparecem, para que seja reforçado o conceito de neoplasias potencialmente malignas, a designação de tumor misto exócrino-endócrino desaparece, e passa a existir um outro grupo, os carcinomas adenoneuroendócrinos. Surge também a categoria das lesões hiperplásicas e pré-neoplásicas. Desaparecem também os conceitos de bem e mal diferenciados, e recomenda-se que os relatórios anátomo-patológicos sejam acompanhados da classificação TNM. A designação de funcional deve ser acrescentada ao diagnóstico apenas quando exista uma síndrome clínica.

A nova classificação estrutura-se com base na morfologia, na imunohistoquímica, particularmente nos marcadores cromogranina A e sinaptofisina, e na avaliação da atividade de proliferação celular do tumor através do índice mitótico. O índice mitótico pode ter uma classificação em três graus, em que o grau 1 (G1) corresponde à existência de menos que 3 figuras mitóticas por 10 campos de ampliação de alta potência, o grau 2 (G2) corresponde à existência de 3 a 20 figuras mitóticas por 10 campos de ampliação de alta potência e o grau 3 (G3) corresponde à existência de mais que 20 figuras mitóticas por 10 campos de ampliação de alta potência. Complementarmente ou em alternativa podemos também avaliar o índice de proliferação celular através da expressão de Ki-67. Aqui a classificação em grau 1 (G1) corresponde a uma expressão em menos de 3% das células, em grau 2 (G2) corresponde a uma expressão em 3 a 20% das células e em grau 3 (G3) corresponde a uma expressão em mais de 20% das células .

A imunohistoquímica, através dos marcadores cromogranina A (*ChA*, *chromogranin-A*) e sinaptofisina (*SYN*, *synaptophysin*) é essencial no diagnóstico dos tumores pancreáticos neuroendócrinos (Kasajima et al., 2015). A cromogranina A é altamente específica (68-100%) e sensível (75-96%) para tumores neuroendócrinos bem diferenciados (Rossi et al., 2015) e está a assumir-se como o marcador mais importante no diagnóstico, no estadiamento e na monitorização dos tumores neuroendócrinos (Metz and Jensen, 2008). Todavia pode não se exprimir nos carcinomas neuroendócrinos pouco diferenciados (Fujiyoshi and Eimoto, 2008). A sinaptofisina tem alta sensibilidade mas não é específica para os tumores pancreáticos neuroendócrinos. Outros marcadores podem ser usados, em conjugação com a cromogranina A e a sinaptofisina, como por exemplo a enolase neuroespecífica (*NSE*, *neuron-specific enolase*) ou a molécula de adesão da célula neuronal (*NCAM*, *neural cell adhesion molecule*) (Kasajima et al., 2015).

Apesar de se tratar de tumores de crescimento lento, não sendo tão agressivos como os adenocarcinomas ductais pancreáticos, uma vez metastizados são de difícil tratamento. Todavia, os avanços no diagnóstico, que já mencionámos, foram também acompanhados por progressos no seu tratamento, como por exemplo novas abordagens no campo da terapia molecular dirigida, com os fármacos everolimus e o sunitib, e a terapia com radionuclídeos dirigida a recetores de peptídeos (PRRT, *peptide receptor radionuclide therapy*) (Kondo and Ikeda, 2014).

A terapia molecular dirigida para os tumores pancreáticos neuroendócrinos avançados G1/G2 está recomendada pela Sociedade Europeia para a Oncologia Médica (*ESMO*, *The European Society for Medical Oncology*) e como “a considerar” pela Sociedade Norte-Americana de Tumores Neuroendócrinos (*NANETS*, *North American Neuroendocrine Tumor Society*) (Kunz et al., 2013; Oberg et al., 2010). A terapia com

everolimus, por exemplo, está recomendada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento dos tumores pancreáticos neuroendócrinos localmente avançados, irressecáveis ou metastizados. Efetivamente, em 16% dos tumores pancreáticos neuroendócrinos ocorrem mutações nos genes que codificam a via de sinalização “alvo da rapamicina em células de mamífero” (*mTOR, mammalian target of rapamycin*) (McKenna and Edil, 2014). O everolimus, um inibidor oral da mTOR tem evidenciado resultados positivos neste subgrupo de tumores, como demonstrado por um ensaio clínico de fase III que envolveu 410 doentes com tumores pancreáticos neuroendócrinos G2/G3, classificados com base no índice de proliferação celular (Costa et al., 2012; Yao et al., 2011). Os pacientes tratados com everolimus apresentaram uma sobrevida livre de progressão de doença de 11 meses comparada com 4,6 meses do grupo placebo (Yao et al., 2011).

O sunitinib é um inibidor oral dos recetores tirosina cinase (*TKI, tyrosine-kinase inhibitor*), do VEGF e do PDGF (*platelet-derived growth factor*), também utilizado e aprovado no âmbito da terapia molecular dirigida a tumores neuroendócrinos. Os tumores pancreáticos neuroendócrinos são muito vascularizados e o VEGF é essencial ao seu desenvolvimento (McKenna and Edil, 2014).

Num ensaio de fase III, envolvendo 171 doentes com tumores pancreáticos neuroendócrinos bem diferenciados, os pacientes tratados com sunitinib apresentaram uma sobrevida livre de progressão de cerca de 11,4 meses, comparada com 5,5 meses no grupo placebo. Neste mesmo estudo, os doentes tratados com sunitinib apresentaram uma taxa de resposta tumoral de 9%, por comparação com os 0% do grupo placebo (Eisenhauer et al., 2009; Raymond et al., 2011).

Entenda-se por taxa de resposta tumoral, a proporção de doentes em que se observa uma resposta completa, isto é, desaparecimento de todas as lesões alvo durante

pelo menos 1 mês, ou parcial, isto é, decréscimo superior ou igual a 30%, em relação à linha de base (Eisenhauer et al., 2009).

O sunitinib também já foi testado no adenocarcinoma ductal pancreático. Num ensaio clínico recente, de fase II, prospectivo e randomizado, foi ensaiado o tratamento com gemcitabina isolada *vs.* gemcitabina associada a sunitinib em adenocarcinomas ductais pancreáticos localmente avançados ou metastizados. A combinação gemcitabina com sunitinib em 28 doentes não demonstrou ser mais eficaz que a gemcitabina isolada em 33 doentes, para além de estar também associada a uma maior toxicidade (Bergmann et al., 2015).

A terapia com radionuclídeos, dirigida a recetores de peptídeos é, como já dissemos, outra opção terapêutica no tratamento dos tumores neuroendócrinos, particularmente a terapia dirigida aos recetores da somatostatina (Shah et al., 2015).

1.10. Recetores da somatostatina, análogos da somatostatina e análogos da somatostatina radiomarcados

Num vasto número de tumores primários e nas suas metástases encontramos uma quantidade significativa de recetores da somatostatina, sendo os mais frequentes os SSTR2 (Dasgupta, 2004).

A somatostatina é um polipeptídeo cíclico que, no ser humano, assume duas formas, uma com 14 aminoácidos e outra com 28 (Liu et al., 2010). A somatostatina 14 é essencialmente produzida nos pulmões, no fígado, no pâncreas, no trato urogenital, nos rins, nas supra-renais e no sistema imunitário. A somatostatina 28 é produzida pelas células epiteliais da mucosa do tubo digestivo (Van Op den Bosch et al., 2009). Trata-se de uma hormona reguladora produzida por neurónios, células neuroendócrines, células imunes e inflamatórias em resposta a neuropeptídeos, iões, nutrientes, hormonas, citocinas e fatores de crescimento (Pinter et al., 2006). Esta hormona regula a neurotransmissão, a secreção glandular, inibe a libertação da hormona do crescimento

(GH), da hormona estimuladora da tiroide (TSH), das hormonas gastrointestinal, de enzimas pancreáticas e de neuropeptídeos, modula a taxa de esvaziamento gástrico, a contração do músculo liso e o fluxo sanguíneo intestinal, e inibe a proliferação quer de células normais quer de células tumorais (Theodoropoulou and Stalla, 2013).

Nos mamíferos, os efeitos fisiológicos da somatostatina são alcançados devido à presença de cinco subtipos de recetores transmembranares (*SSTR*, *somatostatin receptor*) da somatostatina, numerados de 1 a 5, que se encontram acoplados à proteína G, com sete domínios transmembranares altamente conservados, e terminações amino e carboxil específicas (Liu et al., 2010).

Os recetores SSTR1, SSTR3, SSTR4 e STR5 constituem subtipos individuais enquanto o SSTR2 apresenta duas variedades resultantes de *splicing* diferentes, SSTR2a e SSTR2b. Os SSTR1 a STTR4 ligam-se à somatostatina (SST) 14 e 28 com grande afinidade, enquanto que o SSTR5 tem uma afinidade 5 a 10 vezes superior para a somatostatina 28 (Kumar and Grant, 2010).

As funções (Weckbecker et al., 2003) destes recetores estão sumariadas na tabela 6.

Tabela 7 - Funções dos recetores da somatostatina

SSTR1	Inibe secreção GH, prolactina e calcitonina
SSTR2	Inibe secreção da GH, ACTH, insulina, glucagon, interferão γ e ácido clorídrico
SSTR3	Diminui a proliferação celular e induz a apoptose
SSTR4	Desconhecida
SSTR5	Inibe secreção da GH, ACTH, insulina, GLP-1 e amilase

GH – Hormona de crescimento (growth hormone); ACTH – hotmona adrenocorticotrófica (adrenocorticotropic hormone); GLP-1 – peptídeo semelhante a glucagon 1 (glucagon-like peptide-1)

A expressão dos recetores da somatostatina depende do tipo de tumor, com alguns expressando vários subtipos e outros não, e com o tipo predominante de recetor

variando entre tumores (Chalabi et al., 2014). O SSTR2 é o tipo predominante na maioria dos tumores seguido pelo SSTR1, SSTR5 e SSTR3, enquanto o SSTR4 é expresso de forma irregular. Nos tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos predomina o SSTR2 seguido pelo SSTR5 (Weckbecker et al., 2003).

A somatostatina e os seus análogos exercem a sua atividade anti-tumoral diretamente ou indiretamente. Os efeitos diretos compreendem a indução da paragem do ciclo celular, por inibição da sinalização mitogénica induzida pela proteína cinase recetora do fator de crescimento, a inibição da invasão celular e a indução da apoptose. Os efeitos indiretos derivam da sua capacidade anti-angiogénica, assim como da inibição da libertação e dos efeitos dos fatores de crescimento, e das hormonas promotoras do crescimento (Pyronnet et al., 2008).

Está descrita a sobreexpressão de recetores da somatostatina na rede vascular periférica de tumores primários do cólon e do reto, nos cancros do pulmão de pequenas células, nos cancros da mama, e do rim e no linfoma maligno (Guillermet-Guibert et al., 2005)

As propriedades anti-angiogénicas da somatostatina são mediadas pela ativação dos recetores SSTR2 e SSTR3, o que provoca o bloqueio da proliferação e da migração das células endoteliais e da ativação de monócitos. É também inibida a libertação de fatores pro-angiogénicos, como do fator de crescimento do endotélio vascular, do fator de crescimento derivado das plaquetas, do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*IGF-1, insulin-like growth factor 1*), e do fator de crescimento de fibroblastos básico (*bFGF, basic fibroblast growth factor*) (Barbieri et al., 2013).

A expressão do recetor da somatostatina é um pré-requisito para a inibição do crescimento do cancro pancreático pela somatostatina e pelos seus análogos. Admite-se assim que um aumento da concentração de recetores de somatostatina funcionais no

adenocarcinoma pancreático, que à medida que perde a sua diferenciação diminui a expressão destes recetores, possa torná-lo mais sensível ao tratamento pela somatostatina e pelos seus análogos (Sliwinska-Mosson et al., 2014).

A falta de especificidade para os recetores da somatostatina endógena, a sua semi-vida curta (1 a 3 min) e a necessidade de injeção direta no local de ação desejado levou à síntese de análogos de somatostatina (tabela 7) com atividades fisiológicas mais longas, e atuantes em todos os tipos e subtipos de recetores, como terapêutica anti-tumoral (Rai et al., 2015).

São exemplo a síntese do octreótido (Sandostatina LAR[®]), da lanreótida (Somatulina LP[®]), do vapreótido (Sanvar[®]) e do pasireótido (Signifor[®]). Quer o octreótido quer a lanreótida ligam-se sobretudo ao SSTR2, com baixa afinidade para o SSTR3 e para o SSTR5. Comparativamente à somatostatina endógena, possuem uma semi-vida de 1 a 2 horas. O vapreótido tem as mesmas afinidades dos anteriores e afinidade moderada para o SSTR4. O pasireótido, de síntese mais recente, tem altas afinidades para o SSTR1, o SSTR2, o SSTR 3 e o SSTR 5. O vapreótido é usado no tratamento das hemorragias digestivas altas por varizes esofágicas, e o pasireótido no tratamento da doença de Cushing (Barbieri et al., 2013; Hasskarl et al., 2011).

A Tabela 8 apresenta a estrutura de aminoácidos do octreótido, do lanreótido e do vapreótido.

Tabela 8 - Estrutura dos análogos sintéticos da somatostatina

Peptídeo	Estrutura de aminoácidos
Octreótido	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(OH)
Lanreótida	B-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH ₂
Vapreótido	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Cys-Trp-NH ₂

A síntese dos análogos da somatostatina levou ao desenvolvimento da terapêutica com análogos da somatostatina radiomarcados (Reubi, 2003).

Todavia, porque os análogos da somatostatina são capazes de identificar o recetor da somatostatina, mas não são capazes de ligar diretamente o radioisótopo utilizam-se quelantes como o DTPA (ácido dietileno-triamino-penta-acético) e o DOTA (1,4,7,10-tetraaza ciclododecano-1,4,7,10-ácido tetracético) (van der Zwan et al., 2015) e procedeu-se à síntese de derivados do octreótido radiomarcados como o TOC (Tyr³-octreotido), o NOC (I-NaI³-octreotido) e o TATE (Tyr³-octreotato) (Bison et al., 2014).

A opção pela terapêutica com análogos da somatostatina radiomarcados iniciou-se na década de 90, com o [¹¹¹In-[DTPA⁰]octreótido como tentativa de tratamento de doentes com tumores neuroendócrinos metastizados inoperáveis (Kwekkeboom et al., 2010).

O ¹¹¹In liberta electrões de baixa energia (electrões Auger) que podem destruir o ADN, mas só se for internalizado, e se situar junto do núcleo das células. Assim, com os análogo citado, apesar de ocorrer internalização, raramente ocorria regressão tumoral. Foram assim tentados outros radioisótopos, como o ⁹⁰Y e o ¹⁷⁷Lu, que são fontes de partículas β com alta energia e capazes de atuar a uma distância superior, com o benefício adicional de poderem, dessa forma, destruir células tumorais adjacentes que não expressem recetores de somatostatina (Imhof et al., 2011).

Efetivamente, o ítrio-90 (⁹⁰Y) que é um emissor β puro e o lutécio-177 (¹⁷⁷Lu) que é um emissor β e γ são atualmente os radionuclídeos mais utilizados no tratamento com análogos da somatostatina. As partículas β emitidos pelo ⁹⁰Y têm energia máxima de 2 284 keV com penetração tecidual máxima de 11 mm (Borson-Chazot, 2006) tornando-o mais eficaz em tumores maiores com diâmetros idealmente na ordem dos 34 mm, enquanto que as partículas β emitidos pelo ¹⁷⁷Lu têm uma energia máxima de 498

keV com uma penetração tecidual máxima de 1,8 mm (Borson-Chazot, 2006) o que o torna mais adequado para pequenas massas tumorais (Bison et al., 2014).

Uma vez que o ^{177}Lu também emite fotões γ , os peptídeos marcados com ^{177}Lu podem também ser utilizados na monitorização da resposta tumoral (Bison et al., 2014). O ^{177}Lu tem, para além disso, um período de semi-desintegração de 6,7 dias, enquanto o do ^{90}Y é de 2,7 dias (Borson-Chazot, 2006).

Como as partículas β do ^{90}Y têm mais energia e uma penetração tecidual superior, é assim habitualmente utilizado para metástases maiores, enquanto o ^{177}Lu é usado para pequenas metástases. A administração conjunta de ^{90}Y -DOTA-TOC (Tektrotyde) e de ^{177}Lu -DOTA-TOC resultou numa melhoria da sobrevida quando comparada com a administração isolada de ^{90}Y -DOTA-TOC em doentes com tumor neuroendócrino (Villard et al., 2012).

Também o tratamento de 504 doentes com tumores neuroendócrinos gastroentero-pancreáticos metastizados com ^{177}Lu -DOTA-TATE demonstrou uma resposta completa (todos os tumores detetáveis desapareceram) de 2% e uma resposta parcial (cerca de 50% de redução no volume total do tumor) de 28%, uma mediana do tempo para a progressão (o tumor cresceu significativamente ou novos tumores apareceram) da doença de 40 meses e uma sobrevida livre de progressão de 48 meses (Kwekkeboom et al., 2008).

1.11. Recetores da neurotensina

Os recetores da neurotensina foram descobertos por autoradiografia há cerca de 20 anos em cerca de 75% dos adenocarcinomas ductais pancreáticos. Estes dados foram reconfirmados mais tarde por reação em cadeia da polimerase em tempo real (*RT*, *real time-PCR*, *polymerase chain reaction*) demonstrando uma incidências de 90% dos recetores da neurotensina em cancros pancreáticos. Mais tarde foram encontrados

também noutros tipos de cancro (Ehlers et al., 2000). Foram clonados três subtipos de recetores da neurotensina, o recetor 1 (NTR1), o recetor 2 (NTR2) e o recetor 3 ou sortilina (Mazella et al., 2012).

A neurotensina é um peptídeo com 13 aminoácidos localizado no sistema nervoso central e nos tecidos periféricos, particularmente no tubo digestivo. As suas funções biológicas são múltiplas, sendo reconhecida a sua capacidade para promover o crescimento de tecidos gastro-entero-pancreáticos *in vivo* e a proliferação de células dispersas em cultura. Com efeito, as células tumorais não só podem expressar recetores da neurotensina como podem também secretar neurotensina, sugerindo uma regulação autócrina, parácrina e endócrina (Carraway and Plona, 2006).

Um estudo recente realizado em adenocarcinomas ductais pancreáticos, demonstrou a presença de recetores da neurotensina nos tumores primários e nas suas metástases hepáticas, bem como em lesões do tipo PAnIN de grau 3 (Korner et al., 2015).

A presença elevada de recetores da neurotensina em adenocarcinomas ductais pancreáticos levanta a possibilidade de podermos efetuar o seu diagnóstico pela imagem, usando radiotraçadores. Em ratinhos atímicos portadores de tumores HT-29, uma linha de adenocarcinoma colo-retal humano, foi realizado um estudo de diagnóstico por imagem dos tumores com um glicoconjugado de di-arilpirazol marcado com ^{18}F , o qual demonstrou excelente afinidade e seletividade para o recetor 1 da neurotensina, tornando-o um bom candidato para a visualização de tumores com estas características por tomografia de emissão de positrões (*PET, positron emitting tomography*) (Lang et al., 2013).

Num estudo de avaliação clínica usando um análogo da neurotensina radiomarcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc-NT-XI}$), que incluiu quatro pacientes com carcinoma

pancreático exócrino, foi observada captação moderada do radiofármaco pelo tumor num dos pacientes (Buegger et al., 2003).

Mais recentemente o recetor da neurotensina 1 (NTR1) tem-se assumido como alvo potencial para a terapia farmacológica (Wu et al., 2012).

2. Hipótese

Pode a terapia com radionuclídeos dirigida a recetores de peptídeos, ter sucesso no tratamento dos adenocarcinomas ductais pancreáticos, quando associada à quimioterapia?

3. Objetivos

O adenocarcinoma ductal pancreático constitui cerca de 90% de todos os tumores do pâncreas. As suas manifestações clínicas são habitualmente inespecíficas, pelo que o diagnóstico é tardio, encontrando-se o tumor já localmente avançado ou metastizado. Trata-se de um tumor resistente à quimioterapia, à radioterapia e à cirurgia. Esta constitui a única opção terapêutica curativa, quando o tumor é ressecável, o que sucede com os tumores localizados na cabeça do pâncreas. Para os restantes, quer a quimioterapia, quer a radioterapia são paliativas, e a própria cirurgia apresenta frequentes recidivas.

Neste trabalho propomo-nos investigar formas alternativas de tratamento do adenocarcinoma ductal pancreático. Por isso dividimos os objectivos em principal e secundários.

3.1. Objectivo principal

Estudar a ação sinérgica da terapêutica com citostáticos associada à terapêutica com radionuclídeos dirigida a recetores de peptídeos no adenocarcinoma ductal pancreático.

3.2. Objectivos secundários

1. Caracterizar fenotípica e genotipicamente as linhas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático, MIA PaCa-2 e PANC-1.
2. Realizar ensaios de quimioterapia, com fármacos habitualmente utilizados no tratamento dos adenocarcinomas ductais pancreáticos, em primeira linha, como a gemcitabina, ou em segunda linha, como o 5-FU, ou usados em alternativa, como o docetaxel;

3. Realizar ensaios de quimioterapia com fármacos habitualmente utilizados no tratamento dos tumores neuroendócrinos, em primeira linha, como o everolimus e o sunitinib;
4. Estudar a expressão dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 nas linhas em estudo, antes e após submissão a quimioterapia;
5. Realizar estudos de captação com os análogos da somatostatina radiomarcados, como o ^{99m}Tc -TOC, o ^{68}Ga -DOTA-NOC e o ^{177}Lu -DOTA-TATE;
6. Associar à quimioterapia o tratamento com o ^{177}Lu -DOTA-TATE;
7. Analisar, em xenotransplantes heterotópicos, a expressão imunohistoquímica das linhas celulares transplantadas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultura celular

Nos nossos estudos *in vitro* foram utilizadas duas linhas celulares de adenocarcinoma pancreático humano, a linha MIA PaCA-2 e a linha PANC-1 habitualmente referenciadas como modelo de estudo da carcinogénese pancreática.

As linhas celulares MIA PaCa-2 (ATCC[®] CRM-CRL-1420) e PANC-1 (ATCC[®] CRM -CRL-1469) foram adquiridas à American Tissue Cell Culture (ATCC, Manassas, VA, USA) e, após sua receção, foram descongeladas e propagadas. O descongelamento do *ependorf* (Corning[®]) com as células foi feito por agitação suave num banho-maria a 37°C e assim que o conteúdo ficou descongelado, foi transferido para um *falcon* (Corning) estéril de 15 ml contendo 9ml de meio de cultura completo, e centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos (min). O *pellet* celular foi ressuspenso com o meio completo recomendado e colocado num frasco de cultura T75 (Corning) para a propagação celular. As células foram mantidas em cultura com *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (ATCC 30-2002, Manassas, VA, USA) suplementado com soro fetal bovino (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*) inativado pelo calor (ATCC 30-2020) para uma concentração final de 10% (v/v). Para além destes constituintes, ao meio de cultura da linha MIA PaCa-2 era ainda adicionado soro de cavalo (HS, do inglês *Horse Serum*) (ATCC 30-2040, Manassas, VA, USA) de modo a se obter uma concentração final de 2,5% (v/v). Durante a propagação, as células foram mantidas numa incubadora a 37°C com uma atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Para manter a cultura celular, foi feita a sua subcultura sempre que se atingia cerca de 80% de confluência, o que se traduziu em cada 2 a 3 dias, usando um *ratio* de 1:3. Para o efeito, todo o meio de cultura foi removido dos frascos, as células foram lavadas

com 1ml de uma solução salina equilibrada de Hanks com 0,25% de tripsina e 0,53 mM de EDTA (do inglês *Ethylenediamine Tetracetic Acid*) sem cálcio e magnésio (ATCC 30-2101), com o objetivo de remover todos os vestígios de soro, que contém inibidores da tripsina. Ao frasco de T75 foram adicionados 3 ml da solução de tripsina-EDTA e o frasco foi colocado na incubadora a 37°C e numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂, durante 5 a 15 minutos. Durante esse tempo as células foram regularmente observadas no microscópio invertido binocular (Euromex, Holland, Model FE 2950) até que a camada de células se encontrasse dispersa. Para neutralizar a tripsina, foram adicionados 6 ml de meio de crescimento completo e a suspensão celular foi posteriormente transferida para um *falcon* estéril de 15 ml após o que se centrifugou a 1000 rpm durante 5 minutos. Depois da centrifugação retirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células, com cerca de 10 ml de meio completo, procedendo-se à sua redistribuição por novos frascos de cultura estéreis, assegurando-nos de que cada frasco recebeu um número mínimo de células essencial à proliferação *de novo*, habitualmente 10⁶ células/ml.

4.2. Perfil morfológico das linhas celulares

4.2.1. Imunofenotipagem

O perfil morfológico das linhas celulares foi efetuado por imunohistoquímica, uma técnica que permite localizar antigénios em tecidos, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antigénios. A coloração imunohistoquímica é habitualmente utilizada no diagnóstico e caracterização de células anormais, como por exemplo aquelas encontradas em neoplasias (Lin et al., 2015).

Para a caracterização dos adenocarcinomas em estudo optámos pela seleção de marcadores epiteliais [CK5.6, AE1 (citoqueratinas 56.5, 50, 50', 48 e 40), AE1/AE3 (citoqueratinas 65, 67, 64, 59, 58, 56, 52)], mesenquimais (vimentina), de adesibilidade

(E-caderina), endócrinos (cromogranina A, CD56, sinaptofisina) e de recetores hormonais (somatostatina 2 e neurotensina 1) como podemos ver na Tabela 9.

Tabela 9 - Marcadores imunohistoquímicos e controlos utilizados nas linhas celulares MIA PaCA-2 e PANC-1

Marcador	Clone	Origem	Diluição	Tempo (minutos)	Controlo positivo
CK5.6	D5&16B4	Cell Marque, California, USA	1:50	40	Pele
AE1/AE3	AE1/AE3	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK	-	30	Apêndice
E-caderina	36B5	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK	1:100	30	Amígdala
Vimentina	VIM 3B4	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:200	30	Cólon
Cromogranina A	DAK-A3	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:300	30	Pâncreas
CD 56	123C3	DakoCytomation, Glostrup, Denmark	1:100	44	Cólon
Sinaptofisina	Policlonal	Thermo Scientific	1:50	36	Tiróide
Somatostatina 2 (SSTR2)	Policlonal	abcam (ab9550)	1:300	30	Rim
Neurotensina 1 (NTR1)	Policlonal H-130	Santa Cruz (sc-15311)	1:250	30	IAP-I23/13 Xenotransplante Pâncreas

Os marcadores epitélio-mesenquimais poderão afirmar a natureza epitelial e neoplásica das linhas, o marcador de adesibilidade da sua capacidade para a progressão neoplásica, os marcadores endócrinos do carácter endócrino do adenocarcinoma e os

receptores hormonais da viabilidade de utilização da técnica de PRRT com análogos da somatostatina ou da neurotensina.

Os anticorpos primários (Tabela 4) contra a CK5.6 (clone D5&16B4; Cell Marque, California, USA), foram usados com uma diluição de 1:50 durante 40 minutos, enquanto contra o AE1 e o AE3 (clones AE1 e AE3 misturados numa razão de 20:1; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK) foram usados sem diluição e durante 30 minutos. Para a E-caderina usou-se o clone 36B5 (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK) com uma diluição de 1:100 durante 30 minutos, para a vimentina o clone VIM 3B4 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) com uma diluição de 1:200 durante 30 minutos, para a cromogranina A o clone DAK-A3 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) com uma diluição a 1:300 durante 30 minutos, para o CD56, o clone 123C3 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) com uma diluição a 1:100 durante 44 minutos e para a sinaptofisina usámos uma formulação policlonal (Thermo Scientific, MA, USA) com uma diluição a 1:50 durante 36 minutos. No caso dos receptores, para a somatostatina 2 (SSTR2) usou-se uma formulação policlonal (abcam (ab9550), Cambridge, United Kingdom) com uma diluição a 1:300 durante 30 minutos e para a neurotensina 1 (NTR1) usou-se a formulação policlonal H-130 (Santa Cruz Biotechnology (sc-15311), California, United States) com uma diluição a 1:250 durante 30 minutos.

Antes de procedermos à análise imunohistoquímica procedemos à preparação das lâminas, tendo sido utilizadas lâminas de vidro (Lab-Tek Flaskettes glass slides, VWR International, Ref. NUNC 177453) estéreis, de 10 cm², previamente “semeadas” com as células MIA PaCa-2 e PANC-1. Para este propósito, as células foram cultivadas em frascos de cultura, de acordo com o método acima descrito. O número de frascos utilizados dependeu do número de lâminas que foi necessário preparar. Habitualmente

com um frasco de 75 ml conseguimos preparar três lâminas e com um de 25 ml uma lâmina. Quando as células atingiram confluência de pelo menos 80% procedeu-se ao seu destacamento, como já descrito, até se obter uma suspensão celular em *falcon* de 15 ml e com meio novo. A identificação foi efectuada na extremidade não coberta da lâmina, onde se escreveu, a lápis, o nome da linha celular e a data da execução. Depois de se contarem as células, distribuíram-se, na câmara de fluxo laminar, 2×10^6 células por cada lâmina após o que foram colocadas na incubadora onde ficaram a incubar 24 ou 48 horas (conforme a velocidade de aderência e a velocidade de divisão), sem mudar o meio. No fim desse tempo as lâminas foram retiradas da incubadora e com a ajuda de um bisturi descartou-se a câmara plastificada que recobria as lâminas, tendo o cuidado de não danificar a camada de células a elas aderente. Depois de removidos os restos de silicone dos bordos das lâminas colocaram-se as lâminas num *falcon* de 50 ml, imersas em álcool a 95%, duas a duas de modo a que as faces que contém as células ficassem viradas para fora. Nestas condições e à temperatura ambiente e fora do alcance da radiação ultravioleta, podem ser guardadas durante vários meses.

Após obtenção das lâminas necessárias, os anticorpos seleccionados foram aplicados às secções das lâminas que continham as células e estas incubadas à temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas com uma solução salina tamponada com tampão fosfato-salino 8 g de NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,25 g KH₂PO₄ em 800 ml de água destilada (PBS, *phosphate buffered-saline*) (TP-125-PB; Lab Vision Corporation; Fremont CA; USA) e depois incubadas durante 15 minutos com um anticorpo marcado com biotina, o anticorpo anti-polivalente de cabra biotinalado (TP-125-BN; Lab Vision Corporation; Fremont CA; USA). A ligação do anticorpo primário localizou-se aos tecidos usando a estreptavidina conjugada com peroxidase (TP-125-HR; Lab Vision Corporation; Fremont CA; USA), e o 3,3'-

diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB, *diaminobenzidine tetrahydrochloride*) (RE7190-K; Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, United Kingdom) foi usado como cromogénio, de acordo com as instruções do fabricante. A hematoxilina foi usada para contraste das lâminas, por coloração dos núcleos, as quais foram seguidamente desidratadas e montadas. Paralelamente foram usados controlos positivos conhecidos e descritos na Tabela 4. Como controlos negativos foram usadas os controlos positivos sem adição do anticorpo primário.

De referir que apenas os anticorpos CK5.6, CD56 e sinaptofisina foram aplicados num sistema automatizado de coloração de lâminas *BenchMark ULTRA*[®] tendo sido usado um *kit* de deteção *ultraView Universal DAB Detection kit, 760-500*[®], ambos da Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, USA, enquanto que a coloração imunohistoquímica com MNF 116, E-caderina, vimentina, cromogranina A, SSTR2 e NTR1 foi realizada manualmente; os primeiros quatro com o *kit Ultravision Polyvalent HRP (TP-125-HL)*[®] da Lab Vision, CA, USA e os últimos dois com o *Bond*[™] *Polymer Refine Detection* da Leica Biosystems, Newcastle, UK.

A intensidade da coloração das lâminas foi graduada semi-quantitativamente numa escala de três pontos: + (baixa), ++ (média) e +++ (alta) e a percentagem de células imunocoradas foi também registada. A pontuação final foi obtida estabelecendo uma escala, tendo-se adotado o seguinte limiar de reatividade (*cut-off*): reatividade negativa quando o valor for de 0%, reatividade de + para valores inferiores a 10%, reatividade de ++ para valores entre os 10 e os 75% e reatividade de +++ para valores maiores que 75%.

4.2.2. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular, essencial nas ciências biológicas, nomeadamente na fenotipagem celular e na análise da função celular, da

cinética do ciclo celular, na genética, na biologia molecular e na microbiologia (Gross et al., 2015). A citometria de fluxo apresenta várias vantagens em relação à microscopia óptica pelo método clássico pois as células estão vivas e são analisadas em suspensão, a sua deteção é eletrónica, envolvendo milhares a milhões de células, com uma taxa de análise de 2000 a 5000 células por segundo e tem uma sensibilidade elevada. O recurso adicional a fluorocromos possibilita uma avaliação não só quantitativa como qualitativa, permitindo a diferenciação de diferentes subpopulações numa determinada população (Gross et al., 2015).

A observação das células MIA PaCa-2 em microscopia óptica demonstrou a existência de duas populações celulares morfologicamente diferentes. Uma população constituída por células grandes e outra população constituída por células pequenas, agrupadas em mórula. Também por microscopia óptica, na observação da linha celular PANC-1 verificou-se a existência de três populações celulares morfologicamente distintas, uma população de células grandes que se apresentavam isoladas, uma população de células de dimensão intermédia, de configuração estrelada, e uma população de células pequenas, que se apresentavam agrupadas em mórula.

Para esclarecer a possível existência de vários grupos populacionais, isto é, a presença de polimorfismo ou a existência de vários subtipos populacionais, ou seja, a presença de pleomorfismo, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo que, para além de nos permitir uma caracterização morfológica das células em função do seu tamanho e da sua complexidade, permite principalmente uma caracterização em termos de fenótipo celular mediante marcadores específicos usados, conjugados com fluorocromos que serão detetados.

As células MIA Paca-2 e PANC-1 foram dissociadas de acordo com o protocolo já descrito e aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células foram transferidas para um tubo de

análise (BD Biosciences) de 5 ml e lavadas com PBS. Após estes procedimentos as células foram ressuspensas em 500 µl de PBS e adquiridas no citómetro de fluxo (FACS Canto II -BD Biosciences, San Jose, USA) equipado com 3 lasers o que permite uma detecção multiparamétrica com múltiplos fluorocromos usando o software FACS Diva (BD Biosciences, San Jose, USA). Assim foi possível obter e seleccionar as células numa representação gráfica sob a forma de *dot plot* em função do sinal de *forward scatter (FSC)* e do sinal de *side scatter (SSC)*. Foi usado o 7AAD (*7-amino-actinomycin-D*) (Life Technologies, A1310) como marcador de células mortas para confirmar a população não viável, pelo que as vivas foram quantificadas por exclusão.

A técnica de citometria de fluxo (Zhan et al., 2015) foi também utilizada para caracterizar fenotipicamente as células MIA PaCa-2 e PANC-1 quanto à presença de marcadores de células estaminais pancreáticas, como o CD24, o CD44, o CD133/1 e o ESA (CD326) (Zhan et al., 2015). As células estaminais pancreáticas (PCSCs, *pancreatic cancer stem cells*) são responsáveis pela progressão e pela recidiva do tumor, bem como pela sua resistência à quimioterapia e aos efeitos da radiação. Embora não existam marcadores de células estaminais específicos de cancro, os marcadores referenciados são descritos (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007) como úteis na identificação das PCSCs. Assim, repetiu-se o procedimento anteriormente utilizado e, após ressuspensão das células em 100 µl de PBS, às células MIA PaCa-2 foram adicionados 20 µl do anticorpo monoclonal anti-CD24-PE (clone 32D12) (Miltenyi Biotec), 20 µl do anticorpo monoclonal anti-CD44-PerCP/Cy5.5 (clone IM7) (BD Pharmingen), 20 µl do anticorpo monoclonal anti-CD133/1-APC (clone AC133) (Miltenyi Biotec) e 20 µl do anticorpo monoclonal anti-CD326-PE-Cy7 (clone 9C4) (Miltenyi Biotec). Às células PANC-1 foram adicionados 20 µl do anticorpo monoclonal do anti-CD24-FITC (clone ML5) (BD Pharmingen), 20 µl do anticorpo

monoclonal do anti-CD44-APC (clone BJ18) (Biolegend), 20 µl µl do anticorpo monoclonal do anti-CD133/1-PE (clone AC133) (Miltenyi Biotec) e 20 µl µl do anticorpo monoclonal do anti-CD326-PE-Cy7 (clone 9C4) (Biolegend).

As células foram incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. De seguida foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 500 µl de PBS. De forma a perceber a marcação inespecífica de base (background) foram usados como controlos isotípicos negativos (Biolegend) anticorpos anti-ratinho IgG1-PE, IgG2b-PerCP/Cy5.5, IgG1-APC e IgG2b-PE-Cy7 para o CD24, o CD44, o CD133/1 e o CD326 da linha MIA PaCa-1, enquanto para a linha PANC-1 se usaram os anticorpos IgG2a-FITC, IgG1-APC, IgG1-PE e IgG2b-PE-Cy7 como controlos isotípicos negativos (Biolegend) para o CD24, o CD44, o CD133/1 e o CD326.

Todas as amostras foram adquiridas num citómetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, USA) com recurso ao software de aquisição FACS Diva (BD Biosciences, San Jose, USA) e os dados obtidos foram analisados e interpretados com recurso ao mesmo software FACSDiva (BD Biosciences).

4.3. Perfil genético das linhas celulares

A determinação do perfil genético das células das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 teve como objetivo a pesquisa das mutações mais frequentes nos adenocarcinomas pancreáticos (Wood and Hruban, 2015). Dentro destas as escolhidas foram as que ocorrem no proto-oncogene *KRAS*, nos genes supressores tumorais *CDKN2A/p16^{INK4A}*, *TP53* e *SMAD4/DPC4*. Foram igualmente pesquisadas mutações nos genes reparadores de ADN como o *MLH1* e o *MSH2* (Muro et al., 2015), os quais normalmente se encontram presentes quando existe positividade para a pesquisa da instabilidade de microssatélites.

A pesquisa da instabilidade de microssatélites foi realizada através da bateria de marcadores BAT (*Big Adenine Tract*) -25, BAT-26, NR21 [repetição de 21 timinas (T) na extremidade 5' UTR (*untranslated region*) do gene SLC7A8], NR22 (repetição de 22 T na extremidade 3' UTR do gene TPPB5) e NR24 (repetição de 24 T na extremidade 3' UTR do gene ZNF-2) (Williams and Huang, 2013).

Embora a maioria destas mutações já tenha sido estudada nas linhas em causa, quisemos assegurar-nos de que elas se mantinham nas linhas adquiridas por forma a garantir-nos estabilidade na avaliação dos resultados obtidos na estrutura de investigação desenhada para este projeto.

4.3.1. Extração do ADN

O ADN foi extraído das células das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 e do sangue de dadores saudáveis, usados, por ser mais fácil de obter, como controlos negativos das alterações genéticas que pretendíamos pesquisar, recorrendo ao QIAamp DNA mini Kit[®] (Qiagen, Hilden, Germany).

As células foram destacadas e lavadas seguindo os procedimentos já descritos e a sua viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripano (Sigma-Aldrich, 302643). O azul de tripano permite distinguir entre células viáveis e células mortas, uma vez que só estas, ao perderem a capacidade de barreira seletiva da membrana celular, esta se deixa atravessar pelo corante, o que faz com que as células mortas adquiram um tom azulado ao microscópico. Após a coloração da amostra o número de células vivas e de células mortas é contado numa câmara de Neubauer.

A câmara de Neubauer (Figura 1) é uma lâmina fabricada em vidro ótico especial e do tamanho de uma lâmina de microscópico (30x70 mm e 4 mm de espessura), com uma parte central composta por duas câmaras independentes, uma superior e outra inferior, Cada uma destas possui uma grelha de contagem. Cada grelha de contagem

tem 3x3 mm de tamanho e está subdividida em nove quadrantes de 1x1 mm. Os campos superior e inferior são cobertos por uma lamela a 0,1 mm dos quadrados, perfazendo assim um volume de 0,1 mm³ sobre cada quadrado. Como 1 cm³ é aproximadamente equivalente a 1 ml, a concentração de células por ml é a média das células contadas por quadrado x 100. Nestes cálculos teremos de ter em conta o fator de diluição introduzido pela adição do azul de tripano. Na prática diluímos 0,4 g de azul de tripano em 100 ml de água, por forma a obter uma solução 0,4%, e preparamos depois uma suspensão celular homogénea com 100 000 a 500 000 células/ml. Para a contagem celular diluímos um volume, por exemplo 20 µl, de suspensão celular com igual volume da solução de azul de tripano num tubo de *ependorf* (Corning) e contamos o número de células vivas (brancas) e o número de células mortas (coradas de azul) usando os quatro quadrantes laterais da grelha, tendo o cuidado de nunca contar a linha de baixo nem a linha da direita, para não contar as mesmas células duas vezes. Com o número de células vivas e o número de células mortas, calculamos a viabilidade, através da fórmula: (média do número de células vivas nos quatro quadrantes/média do número total de células nos quatro quadrantes) x 100 = % de viabilidade.

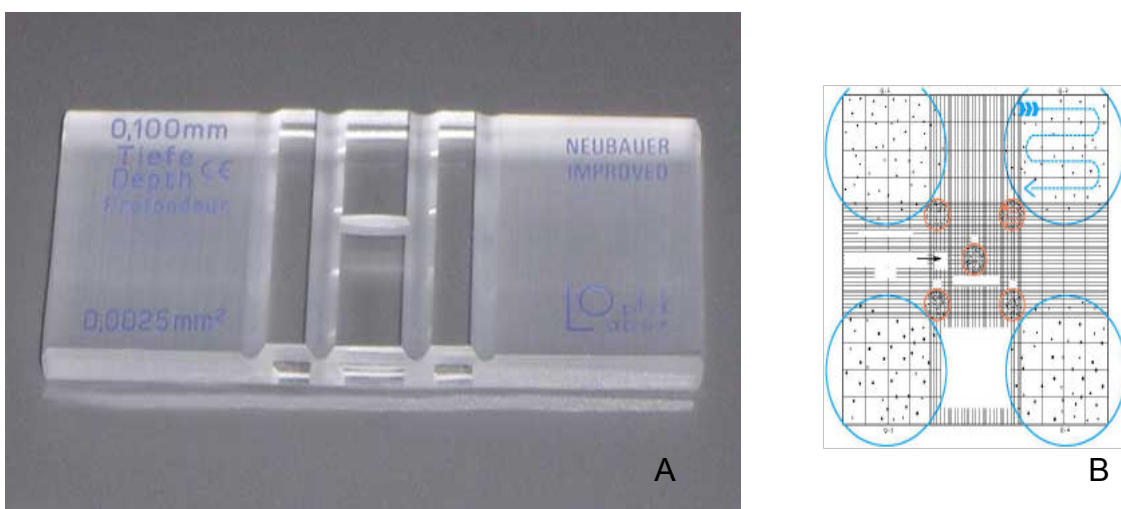


Figura 1 - Câmara de Neubauer (A) e ampliação da grelha de contagem (B)

Após o conhecimento da viabilidade das culturas celulares, prepararam-se as células para a extração do ADN. Para esse objetivo utilizaram-se entre 2 a 5×10^6 células viáveis para cada extração. Após centrifugação durante 5 minutos a 300 G, removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensão em 200 μ l de PBS. A esta suspensão adicionaram-se 20 μ l de proteinase K e 200 μ l de tampão AL, após o que se agitou durante 15 seg no vórtex e se deixou incubar durante 10 min a 56° C. Após incubação adicionaram-se 200 μ l de etanol (96-100%), agitou-se durante 15 seg no vórtex e colocou-se a mistura na coluna QIAamp (aplicada num tubo coletor) e centrifugou-se a 6 000 G durante 1 min. Substituiu-se o tubo coletor por outro, adicionaram-se 500 μ l de tampão AW1 e centrifugou-se novamente a 6 000 G durante 1 min. Repetiu-se o procedimento para 500 μ l de tampão AW2 mas com uma centrifugação de 20 000 G durante 3 min. Para garantir a total eliminação do tampão AW2, mudou-se o tubo coletor e repetiu-se a centrifugação mas apenas durante 1 min. Seguidamente mudou-se a coluna para um tubo de 1,5 ml e adicionaram-se 100 a 200 μ l de tampão AE. Após 5 min centrifugou-se a 6 000 G durante 1 min e preservou-se o eluído a -20°C até quantificação.

Para o sangue isolou-se primeiro o “*buffy coat*” por centrifugação em coluna de Lymphoprep e depois procedeu-se ao mesmo protocolo de extração usando o mesmo *kit* (QIAGEN).

4.3.2. Quantificação do ADN

Quantificou-se o ADN das amostras e procedeu-se à avaliação do grau de pureza por espectrofotometria, com a leitura das absorvâncias dos comprimentos de onda de 260/280 nm e 260/230 nm, considerando-se como normal um valor da razão entre as absorvâncias das amostras compreendido ente 1,8 e 2,0 para a pureza do ADN e entre

1,8 e 2,2, para a pureza dos ácidos nucleicos. Para esta determinação utilizou-se o aparelho de espectrofotometria Nanodrop (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific).

4.3.3. Genotipagem

4.3.3.1. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para a genotipagem do *KRAS*, do *CDKN2A*, do *TP53* e do *SMAD4/DPC4* foram amplificados os respetivos exões e junções intrónicas com os *primers* e temperaturas de *annealing* apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Sequências de primers e temperaturas de annealing utilizados na amplificação dos genes *KRAS*, *CDKN2A/p16^{INK4A}*, *TP53*, *SMAD4/DPC4*.

Genes	Codões	Primers	Temp. de annealing	
<i>KRAS</i>	12 e 13	F: 5'- ACATGTTCTAATATAGTCAC - 3' R: 5'- CTATTGTTGGATCATATTCG - 3'	54 °C	
	61	F: 5'- TTCCTACAGGAAGCAAGTAGT - 3' R: 5'- CATGGCATTAGCAAAGACTC - 3'	56 °C	
<i>CDKN2A/p16^{INK4A}</i>	Exão 1-alpha	F: 5'- ACC GGA GGA AGA AAG AGG AG - 3' R: 5'- TCA GGT AGC GCT TCG ATT CT - 3'	58 °C	
	Exão 2	F: 5'- GTG AGG GGG CTC TAC ACA AG - 3' R: 5'- CAG CAC AGA AAG TTC AGC CC - 3'	60 °C	
	Exão 3	F: 5'- TAC ATG CAC GTG AAG CCA TT - 3' R: 5'- TTC CCC CAC TAC CGT AAA TG - 3'	56 °C	
	Exão 4	F: 5'- TGA CTG CTC TTT TCA CCC A T - 3' R: 5'- GGA AGC CAG CCC CTC AGG GC - 3'	59 °C	
<i>TP53</i>	Exão 5	F: 5'- AAC TCT GTC TCC TTC CTC TT - 3' R: 5'- GCC CCA GCT GCT CAC CAT CGC TA - 3'	58 °C	
	Exão 6	F: 5'- TCT GAT TCC TCA CTG ATT GC - 3' R: 5'- CCA GAG ACC CCA GTT GCA AA - 3'	54 °C	
	Exão 7	F: 5'- GCT GAG GAA GGA GAA TGG - 3' R: 5'- GTG ATG AGA GGT GGA TGG - 3'	57 °C	
	Exão 8	F: 5'- CCT CTT AAC CTG TGG CTT CTC - 3' R: 5'- TAA CTG CAC CCT TGG TCT CCT - 3'	58 °C	
	<i>SMAD4/DPC4</i>	Exão 1	F: 5'- CGTTAGCTGTTGTTTTTCACTG - 3' R: 5'- ACAGTATCTGAAGAGATGGAG - 3'	54 °C
		Exão 2	F: 5'- TGTATGACATGGCCAAGTTAG - 3' R: 5'- CAATACTCGGTTTTAGCAGTC - 3'	51 °C
		Exão 3	F: 5'- CTGAATTGAAATGGTTCATGAAC - 3' R: 5'- GCCCCTAACCTCAAATCTAC - 3'	51 °C
		Exão 4	F: 5'- TTTTGCTGGTAAAGTAGTAGC R: 5'- CTATGAAAGATAGTACAGTTAC	50 °C
Exões 5 e 6		F: 5'- CATCTTTATAGTTGTGCATTATC - 3' R: 5'- TAATGAAACAAAATCACAGGATG - 3'	52 °C	
Exão 7		F: 5'- TGAAAGTTTTAGCATTAGACAAC - 3' R: 5'- TGTACTCATCTGAGAAGTGAC - 3'	50 °C	
Exão 8		F: 5'- TGTTTTGGGTGCATTACATTC - 3' R: 5'- CAATTTTTTAAAGTAACTATCTGA - 3'	52 °C	
Exão 9		F: 5'- TATTAAGCATGCTATACAATCTG - 3' R: 5'- CTTCCACCCAGATTTCAATTC - 3'	50 °C	
Exão 10		F: 5'- AGGCATTGGTTTTTAATGTATG - 3' R: 5'- CTGCTCAAAGAACTAATCAAC - 3'	52 °C	
Exão 11		F: 5'- CCAAAGTGTGCAGCTTGTTG - 3' R: 5'- CAGTTTCTGTCTGCTAGGAG - 3'	54 °C	

F- Forward; R – Reverse. Os mesmos primers foram usados para a primeira PCR e para a sequenciação. As temperaturas de annealing descritas na tabela correspondem às da primeira PCR.

Em cada amplificação usou-se um volume final de 25 μ l, de uma solução constituída por 200 ng de ADN, $MgCl_2$ na concentração de 1,5 mM, dNTPs na concentração de 200 μ M, *primers* na concentração de 0,25 μ M, tampão 1x (Qiagen, Hilden, Germany) e 0,03 U de *Taq DNA Polimerase* (Qiagen, Hilden, Germany).

Após uma desnaturação inicial durante 5 min a 95°C, seguiram-se 35 ciclos de 30 seg a 95°C, correspondentes à desnaturação do ADN, 30 s de *annealing* e 30 s de extensão a 72°C, seguindo-se uma extensão final a 72°C durante 5 min. Para este procedimento utilizou-se o termociclador *MyCycler* (Biorad).

Para controlo das PCRs foram feitas electroforeses, em gel de agarose a 3% com brometo de etídeo, para verificação da intensidade do sinal de fluorescência, isto é, da quantidade de produto formado, e para verificação da especificidade da amplificação, isto é, a não existência de outras bandas para além da desejada. O gel de agarose foi preparado com 4 μ l de brometo de etídeo e 2,25 mg de agarose, num volume final de 75 ml. Para a eletroforese utilizaram-se 5 μ l de produto de PCR, 1 μ l de *loading buffer* tipo IV e 1 μ l de marcador de peso molecular *HiperLadder™ II* ou *ϕ X174 RF DNA/Hae III* (Invitrogen, CA, USA). Para além das amostras correspondentes às linhas celulares utilizaram-se sempre controlos normais que, como foi referido anteriormente, foi o ADN extraído do sangue periférico de indivíduos saudáveis assim como controlos de contaminação, ou seja, amostras sem conterem ADN.

Para os genes *KRAS*, *TP53* e *SMAD4/DPC4*, os segmentos amplificados foram depois sequenciados, para identificar as possíveis mutações pontuais.

Para o gene *CDKN2A/p16^{INK4A}*, como a mutação mais frequente é a deleção em homozigotia, apenas se procedeu à técnica de PCR. Neste caso, em cada eletroforese utilizaram-se como controlos positivos não só amostras de ADN de indivíduos saudáveis, como também se procedeu à amplificação em simultâneo de uma sequência

de *KRAS*, para controlo interno da reação, como garantia de que a ausência de amplificação não se devia a alterações do ADN ou a insucesso da PCR.

4.3.3.2. Sequenciação do ADN

Para a sequenciação do ADN o método usado foi a sequenciação de Sanger. Sequenciaram-se as sequências previamente amplificadas dos genes *KRAS*, *TP53* e *SMAD4/DPC4*.

As amostras foram preparadas para a sequenciação em três etapas: purificação do produto de PCR, reação de sequenciação e segunda purificação.

O produto de PCR foi purificado com o *kit JetQuick* (Genomed) para o que se adicionaram 400 µl da solução H1 por cada 100 µl de produto de PCR e se aplicou a mistura à coluna previamente colocada num microtubo de 1,5 ml após o que se centrifugou-se a 12 000 G durante 1 min. Posteriormente, adicionaram-se 500 µl da solução H2 e repetiu-se duas vezes a centrifugação. Por fim, transferiu-se a coluna para um novo microtubo de 1,5 ml, adicionaram-se 30 µl de água esterilizada diretamente no centro da malha de sílica, e centrifugou-se durante 2 minutos a 12 000 G.

Para a reação de sequenciação utilizaram-se 13 µl de água estéril, 2 µl de tampão (Applied Biosystems, CA, USA), 2 µl de terminadores (*BigDye Terminator v1.1*, Applied Biosystems, CA, USA), 2 µl de *primers* na concentração de 10 µM (só um por cada reação, o *forward* ou o *reverse*), os mesmos usados para a primeira amplificação, e 1 µl do produto de PCR purificado. A reação decorreu num termociclador *MyCycler* (Bio-Rad), durante 1 min a 96°C seguido de 25 ciclos de 10 seg a 96°C, 5 seg a 50°C e 4 min a 60°C.

Para a segunda purificação do produto da reação de sequenciação, aplicou-se uma coluna de resina *Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade* (GE Healthcare, Sweden) e centrifugou-se a 6 000 G durante 1 minuto.

Numa placa de sequenciação aplicou-se uma suspensão constituída por 4 µl da amostra purificada e 12 µl de formamida *Hi-Di*TM (Applied Biosystems). A electroforese capilar foi realizada num sequenciador automático *ABI PRISM 3130* (Applied Biosystems and Hitachi) e os resultados foram analisados com o *software* dedicado *Sequencing Analysis v5.2* (Applied Biosystems, CA. USA).

4.3.3.3. Instabilidade de microssatélites

A avaliação da instabilidade dos microssatélites foi realizada por análise dos fragmentos, com recurso a electroforese capilar. Recorremos a um painel de 5 microssatélites com repetição dos mononucleótidos BAT-25, BAT-26, NR21, NR22 e NR24. Realizou-se uma PCR multiplex para os cinco microssatélites utilizando-se o ADN extraído das linhas celulares e uma amostra controlo de um indivíduo saudável. As sequências dos respetivos *primers* encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Sequências dos *primers* utilizados na deteção de instabilidade de microssatélites

Marcador	GenBank Ref	Repetições	Primer	Fluorocromo	Produto (bp)
BAT25	U41210	Localização 26A <i>CKIT</i> ; intrão 5	F ¹ : 5' - TCGCCTCCAAGAATGTAAGT - 3' R: 5' - TCTGCATTTTAACTATGGCTC - 3'	6-FAM	110-130
BAT26	L04143	25T <i>MSH2</i> ; intrão 16	F ² : 5' - TGACTACTTTTGACTTCAGCC - 3' R: 5' - AACCATTCAACATTTTTAACCC - 3'	TET/VIC	100-120
NR21	XM033393	21(T) <i>SLC7A8</i> ; 5' UTR	F ³ : 5' - TAAATGTATGTCTCCCCTGG - 3' R: 5' - ATTCTACTCCGCATTCACA - 3'	HEX/NED	103
NR22	L38961	22(T) <i>ITMI</i> ; 3' UTR	F ¹ : 5' - GAGGCTTGTC AAGGACATAA - 3' R: 5' - AATTCCGATGCCATCCAGTT - 3'	FAM	142
NR24	X60152	24(T) <i>ZNF-2</i> ; 3' UTR	F ³ : 5' - CCATTGCTGAATTTTACCTC - 3' R: 5' - ATTGTGCCATTGCATTCCAA - 3'	HEX/NED	132

F – Forward; R – Reverse; bp – pares de bases do produto amplificado. Os microssatélites foram amplificados num PCR multiplex com uma temperatura de *annealing* de 55°C.

Para cada microssatélite o primer *forward* foi marcado com um fluorocromo. A identificação de cada *locus* foi efetuada conjugando as diferenças de comprimento dos fragmentos com os diferentes fluorocromos. Estes microssatélites são praticamente monomórficos na espécie humana (Suraweera et al., 2002).

A PCR multiplex foi realizada com um volume total de 25 µl, contendo 40 ng de ADN, 0,16 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,04 U de *Taq DNA polymerase Supreme* (Nzytech, Lisboa, Portugal) e tampão 1x (Nzytech, Lisboa, Portugal).

Para a amplificação estabelecemos os seguintes parâmetros: 5 min a 94°C para a desnaturação inicial, e efetuámos depois 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 seg cada, *annealing* a 55°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, finalizando a reação com uma extensão final de 10 min a 72°C.

O produto de PCR foi diluído com água esterilizada na razão de 1:10 e adicionaram-se 3 µl desta suspensão a 15 µl de formamida e a 0,5 µl de *Gene Scan™ - 500LIZ* (Applied Biosystems), um marcador fluorescente. O *GS500LIZ* é um “*ladder*” de ADN, ou seja, tem fragmentos entre os 35 e os 500bp, e o software utiliza três destes fragmentos para calcular o tamanho de um fragmento desconhecido na amostra. A amostra foi desnaturada por aquecimento a 95°C durante 4 min, e rapidamente colocada em gelo durante mais 4 a 5 min. Seguidamente aplicaram-se 15 µl do produto do PCR numa placa de sequenciação. A eletroforese capilar para análise de fragmentos foi mais uma vez realizada no sequenciador automático *ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, CA, USA), usando o polímero POP7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para a análise dos fragmentos utilizou-se o *software* dedicado *GeneMapper V3.7* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A presença de três ou mais alelos mutantes foi considerada indicativa de instabilidade de microssatélites - MSI-high (MSI-H).

Não se verificando instabilidade de microssatélites não se faz a pesquisa de mutações nos genes reparadores de ADN, *MLH1* e *MSH2* porque estes genes estão normalmente associados à instabilidade de microssatélites.

4.4. Estudos de captação com análogos da somatostatina

Os estudos de captação basearam-se na determinação da percentagem de influxo de três análogos da somatostatina marcados com radioelementos, o ^{99m}Tc -Tektrotyde (^{99m}Tc -TOC), ^{68}Ga -DOTA (1,4,7,10-tetraaza ciclododecano-1,4,7,10-ácido tetracético) – NOC (1-NaI(3)-octreótido) e ^{177}Lu -DOTA-TATE [(Tyr³)-octreotato] pelas células das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1.

O objetivo dos estudos de captação foi determinar o influxo ao longo do tempo dos análogos de somatostatina mencionados e comparar a captação entre as duas linhas celulares em estudo, a MIA PaCa-2 e a PANC-1 (Abrantes et al., 2010).

Após tripsinização das células procedeu-se à sua contagem na câmara de Neubauer e preparou-se uma suspensão celular com 2×10^6 células/ml em frascos T25. Após uma hora de repouso, para os estudos de influxo, foram adicionados às suspensões celulares os radiofármacos ^{99m}Tc -Tektrotyde, ^{69}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE, usando uma atividade de 25 $\mu\text{Ci/ml}$. Aos 5, 30, 60, 90 e 120 minutos retiraram-se duas alíquotas de 200 μl da suspensão celular para dois tubos de *ependorf* contendo PBS gelado. Estas amostras foram depois centrifugadas a 125 G durante 60 segundos, para completa separação entre o *pellet* e o sobrenadante, sendo este posteriormente recolhido para um tubo identificado. O *pellet* foi depois lavado com 500 μl de PBS gelado e repetido o procedimento de separação do sobrenadante, o qual foi adicionado ao sobrenadante anterior. Após incubação das células com os radiofármacos durante os

tempos referidos e a colheita separada dos *pellets* e dos sobrenadantes, procedeu-se ao cálculo da percentagem de captação de cada radiofármaco pelas células, para cada tempo. A atividade dos *pellets* e dos sobrenadantes resultantes da incubação com o ^{99m}Tc -Tektrotyde foi medida num contador de poço (DPC Gamma C12). A atividade dos *pellets* e dos sobrenadantes resultantes da incubação com ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE foram medidas num outro contador de poço (CAPINTEC CRC-15W). Pela contagem de ambas as frações (*pellets* e sobrenadantes) nos contadores de poço, em contagens por minuto (CPM), quantificou-se a percentagem de captação do radiofármaco pelas células utilizando a equação:

$$\% \text{ Captação} = \frac{CPM_{\text{pellet}}}{CPM_{\text{pellet}} + CPM_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de tripano no finalizar de cada experiência.

4.5. Estudo dos recetores de somatostatina

Com o objetivo de avaliar a tipo e a quantidade dos recetores da somatostatina presentes nas linhas celulares em estudo avaliámos os diferentes subtipos de recetores de somatostatina: os SSTR1, os SSTR2a, os SSTR2b, os SSTR3, os SSTR4 e os SSTR5, recorrendo à técnica de citometria de fluxo.

Após tripsinização das células procedeu-se à sua contagem pelo método de exclusão do azul de tripano, usando a câmara de Neubauer, e preparou-se uma suspensão celular com 1×10^6 células/ml, a qual foi colocada num tubo de citómetro.

Como anticorpos primários foram utilizados os seguintes anticorpos da Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, Texas, USA: o SSTR1 (C-17, sc-11604), o SSTR2a (C-15, sc-11608), o SSTR2b (C-15, sc-11609), o SSTR3 (W-15, sc-11614), o SSTR4

(C-15, sc-11619), o SSTR5 (C-15, sc-11623) e como anticorpo secundário o anticorpo de ratinho anti-cabra IgG-FITC (*fluorescein isothiocyanate*).

O tubo com a suspensão celular foi centrifugado a 125 G durante 5 minutos, após o que se procedeu à decantação do sobrenadante. Ao centrifugado adicionaram-se 3 µl de cada anticorpo primário, a que se seguiu homogeneização no vórtex e incubação durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação procedeu-se à adição de 2 ml de PBS (1x) e posterior centrifugação a 125 G durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante resultante e adicionou-se 2 µl do anticorpo secundário. As células foram incubadas durante 20 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Após incubação procedeu-se à adição de 2 ml de PBS (1x) e posterior centrifugação a 125 G durante 5 minutos. Foi depois decantado o sobrenadante e ao centrifugado adicionados 400 µl de PBS (1x). As células foram agitadas suavemente no vórtex e guardadas no frio até leitura no citómetro.

Após calibração do citómetro com células não marcadas e marcadas, com um controlo isotipo na primeira década, definiu-se que as células que tivessem fluorescência superior a 10 seriam positivas para a presença de recetores da somatostina.

A nossa análise foi realizada num citómetro de fluxo com seis parâmetros e quatro cores FACSCalibur™ (Becton Dickinson). Para cada ensaio, foram selecionados, usando o *software* CellQuest (Becton Dickinson), pelo menos 10⁴ eventos, que foram posteriormente analisados usando o *software* Paint-A-Gate (Becton Dickinson).

4.6. Modulação celular com citostáticos

No contexto desta investigação, avaliámos o efeito de vários citostáticos em diferentes concentrações. Os citostáticos usados foram a gemcitabina (Gemzar®), um análogo dos nucleósidos, o 5-fluorouracilo (5-FU) (Sigma F6627), um análogo da

pirimidina que inibe a timidilato sintetase, o everolimus (Sigma 07741), um imunossupressor que atua como inibidor mTOR, o docetaxel (Taxotere[®]), um taxano, com ação anti-mitótica e o sunitinib (Heta Pharm & Chem CO., Ltd.), um inibidor dos recetores da tirosina-quinase. Os efeitos dos citostáticos foram avaliados através da atividade metabólica, viabilidade e morte celulares, e ciclo celular, das linhas celulares de adenocarcinoma pancreático MIA PaCa-2 e PANC-1, após 24, 48, 72 e 96 horas de incubação com cada um.

4.6.1. Avaliação da atividade metabólica das células

A atividade metabólica das células foi avaliada através do teste colorimétrico MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), descrito por Mosmann (Mosmann, 1983). Este teste baseia-se na capacidade que as células vivas têm para reduzirem o MTT, o qual após ser endocitado é reduzido por desidrogenases celulares com formação de cristais de formazano de cor roxa que se acumulam no interior das células. Estes cristais, quando solubilizados, conferem à suspensão uma cor roxa cuja intensidade pode ser medida por espectrofotometria. A absorvância da solução resultante da dissolução dos cristais é diretamente proporcional à quantidade de MTT reduzido, a qual, por sua vez, reflete a capacidade redutora das células e, conseqüentemente, a sua atividade metabólica. Assim, através do valor de absorvância obtido para as diferentes condições predefinidas para a experiência, podemos inferir acerca da correspondente atividade metabólica.

Os resultados obtidos através das curvas dose-resposta correspondentes a cada citostático utilizado foram analisados e processados usando o *software* OriginPro 8.0, sendo a citotoxicidade expressa como a percentagem de inibição da actividade metabólica correlacionada com experiências de controlo, o que permite determinar, através de um ajuste a uma sigmóide (distribuição de Maxwell-Boltzmann), a

concentração do fármaco que inibe 50% da atividade metabólica (IC₅₀) celular (Mamede et al., 2012).

4.6.2. Avaliação da viabilidade e da morte celulares

Para podermos avaliar a viabilidade e a morte celulares, assim como o ciclo celular, recorreremos à técnica de citometria de fluxo. Para estes estudos, foram semeadas 1×10^6 células em frascos de cultura T75 (Corning) que após ocorrer a adesão foram incubadas durante 72 horas com o IC₅₀ determinado para cada composto.

A viabilidade e a morte celulares foram analisadas através do duplo ensaio de incorporação de anexina V e de iodeto de propídeo (AV/PI, *annexin-V/propidium iodide*). Esta técnica baseia-se no comportamento da fosfatidilserina durante a apoptose. A fosfatidilserina é um fosfolípido que nas células apoptóticas é translocado do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. Ao ser exposta externamente, a fosfatidilserina liga-se à anexina V. Quando a necrose ocorre, a integridade da membrana celular fica comprometida e o iodeto de propídeo atravessa-a e intercala-se no ADN (Abrantes et al., 2010).

Para se poder realizar este ensaio as células foram inicialmente centrifugadas a 1 300 G durante 5 minutos, após o que foram incubadas à temperatura ambiente e no escuro durante 15 minutos com 100 µl do tampão de ligação constituído por 0,01 M de HEPES a pH 7.4 (Sigma H7523), por 0,14 M de NaCl (Sigma S7653), por 0,25 mM de CCl₂ (Sigma C4901), e com 2,5 µl de AV-FITC (Immunostep ANXVF) e 1 µl de PI (Immunostep). Após o tempo de incubação, foram adicionados 400 µl do tampão de ligação e as células foram analisadas por citometria de fluxo, tendo sido usada uma fluorescência máxima de excitação/emissão nos 495 nm/ 519 nm para a anexina V, FITC e nos 535 nm/ 617 nm para o iodeto de propídeo (Abrantes et al., 2010).

Utilizou-se um citómetro de fluxo com seis parâmetros e quatro cores FACSCalibur™ (Becton Dickinson) e para cada ensaio, foram selecionados, usando o *software* CellQuest (Becton Dickinson), pelo menos 10^4 eventos, que foram posteriormente analisados usando o *software* Paint-A-Gate (Becton Dickinson), e permitiram determinar a percentagem de células viáveis (negativas para a anexina V e para o iodeto de propídeo), a percentagem de células em apoptose precoce (positivas para a anexina V e negativas para o iodeto de propídeo), a percentagem de células em apoptose tardia/necrose (positivas para a anexina V e para o iodeto de propídeo) e a percentagem de células em necrose (negativas para a anexina V e positivas para o iodeto de propídeo) (Abrantes et al., 2010).

4.6.3. Avaliação do ciclo celular

Para avaliar o ciclo celular foi usado o ensaio de intercalação com iodeto de propídeo uma vez que este corante se intercala na macromolécula de dupla cadeia do ADN. A quantificação do conteúdo em ADN permite-nos conhecer a distribuição de uma população celular ao longo das diferentes fases do ciclo celular, uma vez que a quantidade de corante ligado é proporcional à quantidade de ADN existente. Todavia, uma vez que o iodeto de propídeo também se liga ao ARN, é necessário remover este, através de um tratamento com uma nuclease (RNase, do inglês *Ribonuclease*). Para realizar este ensaio, as células foram centrifugadas a 1 300 G durante 5 minutos e depois ressuspensas, sob agitação constante, em 200 µl de etanol a 70% (Panreac 361085). Após 30 minutos de incubação a 4°C na escuridão, as células foram lavadas com PBS e depois incubadas com PI/RNase (Immunostep). Após homogeneização as células foram incubadas no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente e depois analisadas por citometria de fluxo, tendo sido usada uma fluorescência máxima de excitação/emissão nos 535 nm/617 nm (Abrantes et al., 2010).

Utilizou-se um citómetro de fluxo com seis parâmetros e quatro cores FACSCalibur™ (Becton Dickinson) e para cada ensaio, foram selecionados, usando o *software* CellQuest (Becton Dickinson), pelo menos 10^4 eventos, que foram posteriormente analisados usando o *software* Paint-A-Gate (Becton Dickinson) (Abrantes et al., 2010).

4.7. Perfil morfológico das células após quimioterapia

Pretendíamos saber se o perfil morfológico das células das linhas celulares em estudo se tinha alterado após submissão aos citostáticos, pelo que procedemos à cultura das células das linhas celulares MIA PaCa.-2 e PANC-1 em frascos de cultura T75 (Corning, NY, USA). Quando as células atingiram 80% de confluência o meio foi substituído e as células foram incubadas durante 72 horas com uma concentração dos citostáticos correspondente ao respectivo IC50 determinado nas experiências anteriores (Tabela 12).

Tabela 12 - IC50 às 72 h dos citostáticos utilizados nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1

	Gemcitabina	5-FU	Everolimus	Docetaxel	Sunitinib
MIA PaCa-2	657,31 μ M	52,95 μ M	24,94 μ M	0,0008 μ M	4,53 μ M
PANC-1	216,45 μ M	17,73 μ M	21,56 μ M	0,0360 μ M	7,91 μ M

Depois de 72 h de incubação as células foram destacadas e ressuspensas em meio de cultura, tendo-se posteriormente procedido à sua propagação em lâminas de vidro *Lab-Tek Flaskette glass slides* (VWR International, PA, USA, Ref. NUNC 177453) estéreis, de 10cm², conforme protocolo já descrito.

Uma vez obtidas estas lâminas procedeu-se à marcação das mesmas com os marcadores imunohistoquímicos selecionados e de acordo com o protocolo já descrito.

4.8. Avaliação dos recetores de somatostatina após ação quimiossensibilizante dos citostáticos

Esta parte da investigação pretendia avaliar o efeito dos fármacos utilizados nos ensaios de quimioterapia, sobre a expressão dos recetores da somatostatina, por forma a verificar se a existirem alterações elas poderiam posteriormente explicar a captação do ^{177}Lu -DOTA-TATE.

Para tal procedeu-se à cultura das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 em frascos de cultura T75 e, quando as células atingiram 80% de confluência, o meio foi substituído, e as células foram incubadas durante 72 h com o IC50 dos citostáticos determinado nas experiências anteriores (Tabela 7). Posteriormente, seguiu-se o mesmo procedimento já descrito em 4.5.

4.9. Estudos de captação após modulação celular com citostáticos

Nesta parte das experiências pretendíamos saber se uma prévia incubação das células com citostáticos aumentava a captação do radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-TATE, que é utilizado na clínica com fins terapêuticos (Bison et al., 2014).

O lutécio-177 (^{177}Lu) é um emissor β e γ utilizados no tratamento com análogos da somatostatina. As partículas beta emitidas pelo ^{177}Lu têm uma energia máxima de 498 keV com uma penetração tecidual máxima de 1,8 mm (Borson-Chazot, 2006) tornam-no mais adequado para pequenas massas tumorais (Bison et al., 2014).

Uma vez que o ^{177}Lu também emite fotões γ , os peptídeos marcados com ^{177}Lu podem ser utilizados na monitorização da resposta tumoral (Bison et al., 2014). O ^{177}Lu tem, para além disso, um período de semi-desintegração de 6,7 dias (Borson-Chazot, 2006).

Para realizar esta investigação foram distribuídas por placas 4×10^6 células. Após 24 horas o meio foi substituído e as células MIA PaCa-2 e PANC-1 foram incubadas durante 24 horas com gemcitabina na concentração de 500 μM , com 5-FU na

concentração de 120 μM , com docetaxel na concentração de 0,005 μM , com everolimus na concentração de 1 μM e com sunitinib na concentração de 0,01 μM .

A concentração destes fármacos foi selecionada com base nas curvas dose-resposta obtidas às 24 horas e com a certeza de que as concentrações escolhidas eram incapazes de inibir a proliferação celular. Após 24 horas de incubação as células foram destacadas e ressuspensas em meio, de modo a se obter uma concentração celular de 2×10^6 células/ml que posteriormente foram incubadas com 25 μCi de ^{177}Lu -DOTA-TATE durante 120 minutos.

4.10. Perfil morfológico dos xenotransplantes

Os xenotransplantes foram desenvolvidos após injeção subcutânea de 5×10^6 células de cada linha celular no dorso de ratinhos atímicos Balb/c, do sexo feminino, com 6 a 8 semanas de idade.

O tamanho dos tumores que se vieram a desenvolver foi medido todos os dias com um paquímetro, aguardando que atingissem um volume aproximado de 300 mm^3 . Este volume tumoral foi calculado de acordo com a fórmula $V = (A^2 \times B)/2$ em que A corresponde ao diâmetro maior do tumor e B ao diâmetro menor (Dagrosa et al., 2003). A partir dos 300 mm^3 foi monitorizado e registado o crescimento do tumor durante 12 dias. Os procedimentos experimentais realizados obedeceram aos procedimentos éticos vigentes na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e foram executados de acordo com as orientações da instituição. O alojamento dos animais decorreu em gaiolas ventiladas, sob temperatura e humidade controladas, com ciclos de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Foram disponibilizados aos animais água e alimento *ad libitum*.

Após os 12 dias de monitorização do crescimento do tumor, os animais foram sacrificados e o tumor extraído, sendo as amostras remetidas para Anatomia Patológica. Aqui foi feita a inclusão do tecido do xenotransplante em parafina e obtidas secções de

3 µm com controlos de hematoxilina-eosina e marcação imunohistoquímica conforme procedimento já descrito em 4.2.1.

4.11. Pesquisa Bibliográfica

Foi realizada, até agosto de 2015, uma revisão sistemática da literatura utilizando várias bases de dados como a PubMed, Cochrane Database, ISI Web of Science, e o Index de Revistas Médicas Portuguesas.

A pesquisa efetuada nas bases de dados foi feita usando os termos de pesquisa adequados para cada base.

Excluíram-se todos os artigos anteriores aos últimos 15 anos, e noutros idiomas que não o português, o inglês e o francês, assim como os casos clínicos. Não se excluíram estudos em linhas celulares ou em animais.

Para além das bases de dados citadas, o autor também utilizou referências dos artigos que selecionou para identificar artigos adicionais de interesse, se aplicável

4.12. Análise estatística

Os diferentes dados obtidos no decorrer do presente estudo foram objecto de análise, que foi realizada por intermédio de diverso *software* apropriado a cada caso. Por exemplo, diferentes tipos de gráficos foram realizados recorrendo a Microsoft Excel, R, GraphPad, IBM SPSS v20 e Matlab R2014. A análise estatística foi maioritariamente realizada em IBM SPSS v20, apesar de em alguns tipos de ajustes de modelos se tenha optado por utilizar Matlab, devido à sua maior versatilidade.

A análise dos dados foi efetuada segundo duas perspetivas complementares entre si: a descritiva e a inferencial. Sempre que julgado conveniente, os resultados obtidos foram descritos analítica e/ou graficamente. No primeiro caso apresentam-se tabelas das medidas de tendência central (*e.g.* média, mediana), e de dispersão, adequadas a cada caso particular. Os gráficos foram escolhidos de acordo com o tipo de variável –

nominal, ordinal ou quantitativa – que se pretendia representar, e com o tipo de informação que se pretendia transmitir. Em determinados casos apresentou-se ainda informação de dispersão, por intermédio de barras de erro, e de inferência, pelo uso de intervalos de confiança. A análise inferencial foi realizada tendo em conta a questão específica que se procurava responder, o tipo de variável em causa, e o número de medidas disponíveis. Devido ao diminuto número de medidas, ou ao facto das variáveis em causa serem ordinais, optou-se pela utilização de testes não paramétricos, pelo que a comparação de grupos independentes foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, nas situações em que se tinha mais do que dois grupos, e pelo teste de Mann-Whitney, para pares de medidas. Utilizou-se ainda a correção de Dunn-Sidak, nos testes *post-hoc* realizados após o teste de Kruskal-Wallis. O valor crítico tomado como significativo do ponto de vista estatístico foi de 5% ($\alpha = 0.05$).

A análise realizada aos dados relativos à captação, e às curvas dose-resposta, foi efetuada tendo por base o ajuste a uma curva dada por uma equação matemática, sendo reportado o valor de R^2 como indicador de sucesso do ajuste.

5. Resultados

5.1. Perfil morfológico das linhas celulares

5.1.1. Imunofenotipagem

A observação microscópica da linha MIA PaCa-2 revelou a presença de duas populações celulares com padrões morfológicos distintos. Uma população constituída por células grandes e uma segunda população composta por células pequenas dispostas em mórula. Estas duas populações celulares também apresentavam diferentes características de imunofenotipagem, as quais se encontram resumidas na Tabela 13.

Tabela 13 - Imunofenotipagem da linha celular MIA PaCa-2

Marcador	Morfologia	Resultado
CK5.6	Células grandes	+++
	Células pequenas (mórula)	++
AE1/AE3	Células grandes	+++
	Células pequenas (mórula)	+++
E-caderina	Células grandes	+++
	Células pequenas (mórula)	+++
Vimentina	Células grandes	+++
	Células pequenas (mórula)	++
Cromogranina A	Células grandes	-/+
	Células pequenas (mórula)	+++
CD 56	Células grandes	-/+
	Células pequenas (mórula)	-
Sinaptofisina	Células grandes	+
	Células pequenas (mórula)	-
SSTR2	Células grandes	+++
	Células pequenas (mórula)	+++
NTR1	Células grandes	++
	Células pequenas (mórula)	++

Cut off - (0%); + (<10%); ++ (10-75%); +++ (>75%).

Como podemos ver na Tabela 13, a linha MIA PaCa-2 expressa CK5.6 (Fig. 2A), AE1/AE3 (Fig. 2B), E-caderina (Fig. 2C), vimentina (Fig. 2D), cromogranina A (Fig. 2E), sinaptofisina (Fig. 2F), SSTR2 (Fig. 2G) e NTR1 (Fig. 2H) e, não expressa CD56.

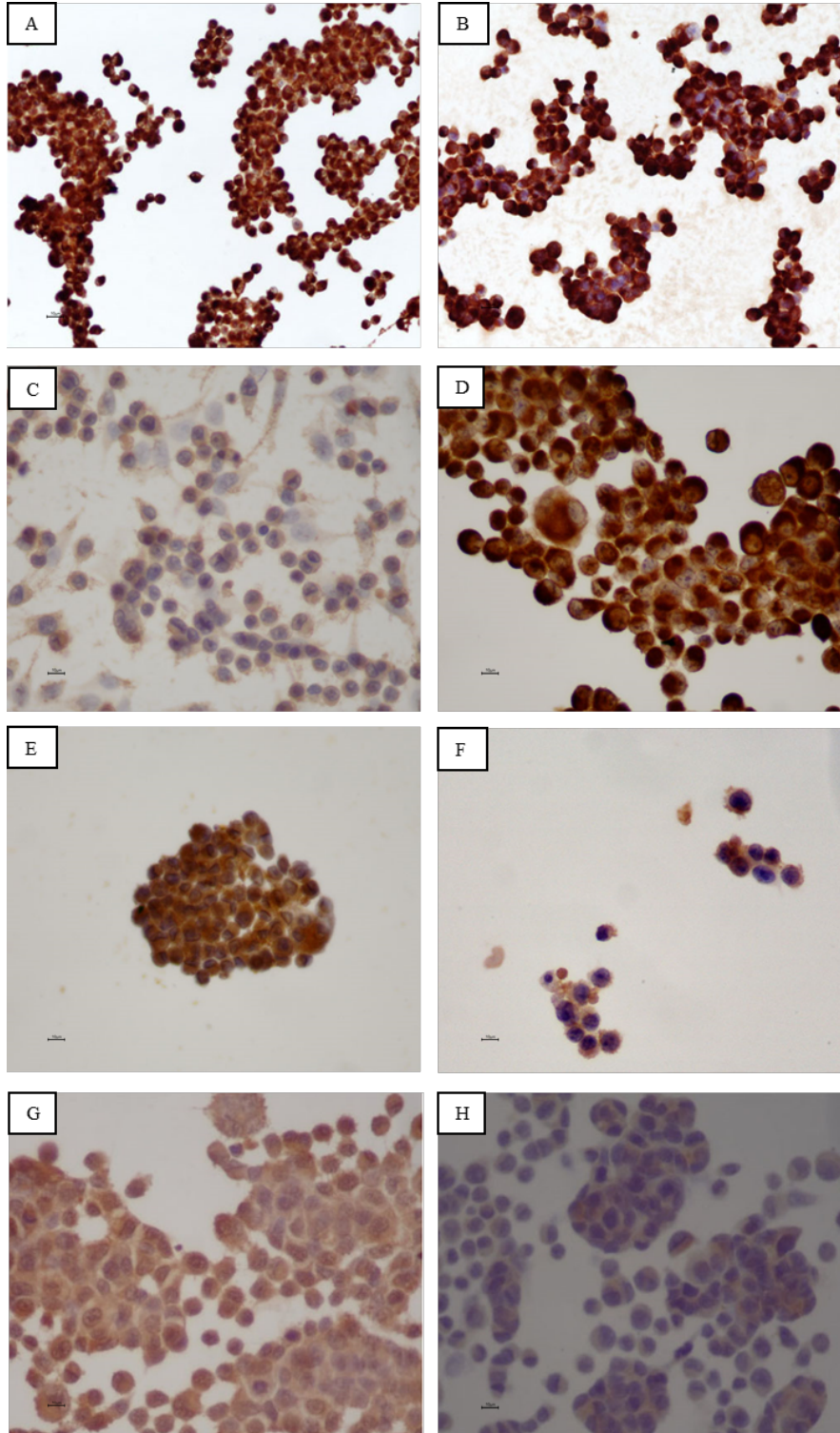


Figura 2 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica. A: CK 5.6 x200; B: AE1/AE3 x200; C: E-Caderina x400; D: Vimentina x400; E: Cromogranina A x400; F: Sinaptofisina x400; G: SSTR2 x400; H: NTR1 x400. Barra de escala: 10 µm.

Em relação à linha PANC-1, a sua observação microscópica revelou a presença de três populações com padrões morfológicos distintos. Uma das populações é constituída por células grandes e isoladas, outra população é constituída por células de tamanho intermédio e de morfologia estrelada e, finalmente, a terceira população constituída por células pequenas dispostas em mórula. Estas três populações celulares apresentavam diferentes características de imunofenotipagem, as quais se encontram resumidas na Tabela 14.

Tabela 14 - Imunofenotipagem da linha celular PANC-1

Marcador	Morfologia	Resultado
CK5.6	Células grandes (isoladas)	++
	Células intermédias (estreladas)	++
	Células pequenas (mórula)	-
AE1/AE3	Células grandes (isoladas)	++
	Células intermédias (estreladas)	++
	Células pequenas (mórula)	+++
E-caderina	Células grandes (isoladas)	-
	Células intermédias (estreladas)	-
	Células pequenas (mórula)	-
Vimentina	Células grandes (isoladas)	++
	Células intermédias (estreladas)	++
	Células pequenas (mórula)	+++
Cromogranina A	Células grandes (isoladas)	+
	Células intermédias (estreladas)	+
	Células pequenas (mórula)	-
CD 56	Células grandes (isoladas)	+
	Células intermédias (estreladas)	+
	Células pequenas (mórula)	-
Sinaptofisina	Células grandes (isoladas)	-
	Células intermédias (estreladas)	-
	Células pequenas (mórula)	-
SSTR2	Células grandes (isoladas)	+ (citoplasma polarizado)
	Células intermédias (estreladas)	+
	Células pequenas (mórula)	++
NTR1	Células grandes (isoladas)	-
	Células intermédias (estreladas)	-
	Células pequenas (mórula)	-

Cut off - (0%); + (<10%); ++ (10-75%); +++ (>75%).

Como podemos verificar na Tabela 14, a linha PANC-1 expressa CK5.6 (Fig. 3A), AE1/AE3 (Fig. 3B), vimentina (Fig. 3C), cromogranina A (Fig. 3D), CD56 (Fig. 3E) e SSTR2 (Fig. 3F) e, esta linha não expressa E-caderina, sinaptofisina e NTR1.

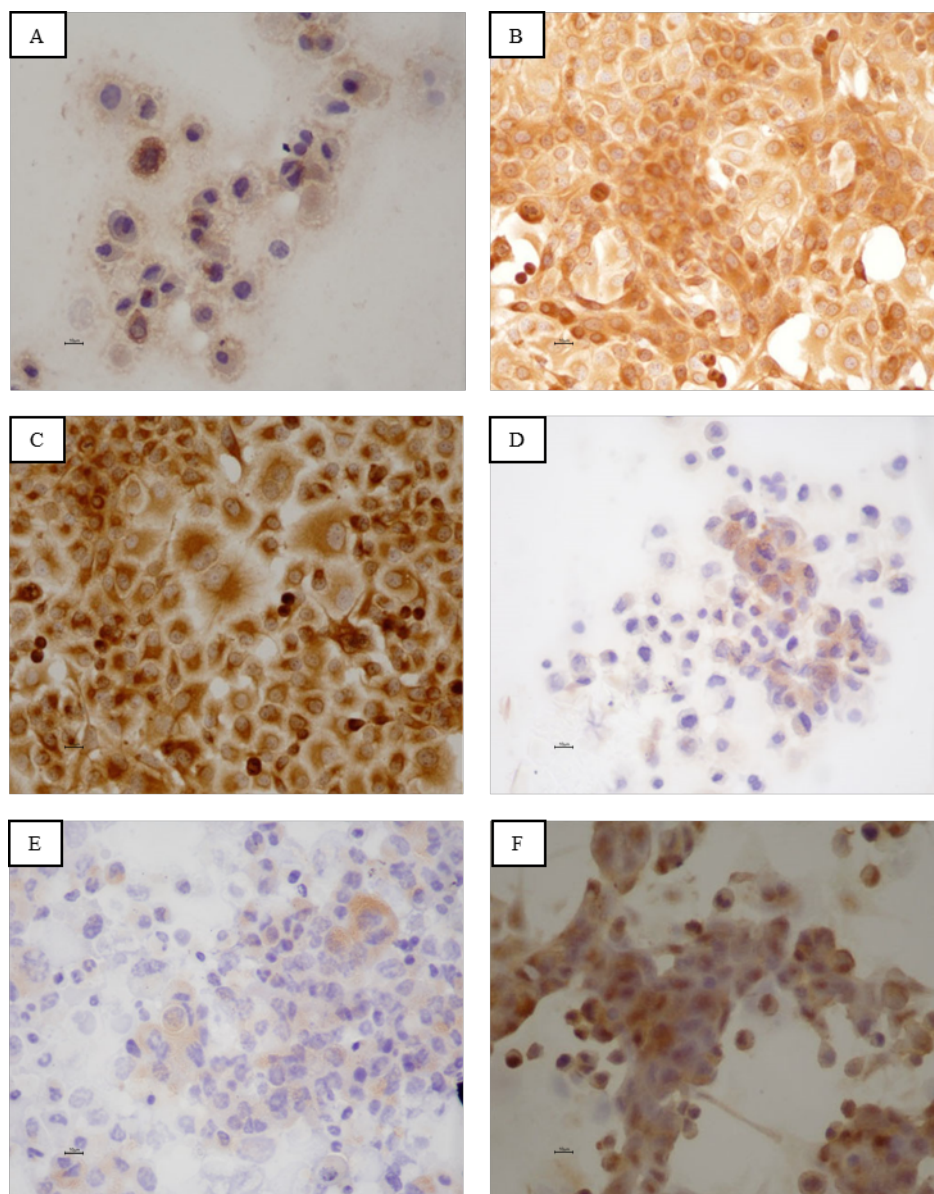


Figura 3 - PANC-1: Imunohistoquímica. **A:** CK 5.6 x400; **B:** MNF 116 x200; **C:** Vimentina x200; **D:** Cromogranina A x400; **E:** CD56 x400; **F:** SSTR2 x400. Barra de escala: 10 µm.

Os gráficos seguintes apresentam os dados respeitantes aos marcadores imunohistoquímicos avaliados nas duas linhas celulares em estudo, as MIA PaCa-2 e as PANC-1. Cada ponto na linha radial representa um marcador imunohistoquímico e a

linha distribui-se por uma escala que vai desde - a +++. As células grandes e as células pequenas foram testadas para nove marcadores. O Gráfico 1 apresenta os resultados comparativos entre as duas linhas celulares para as grandes células.

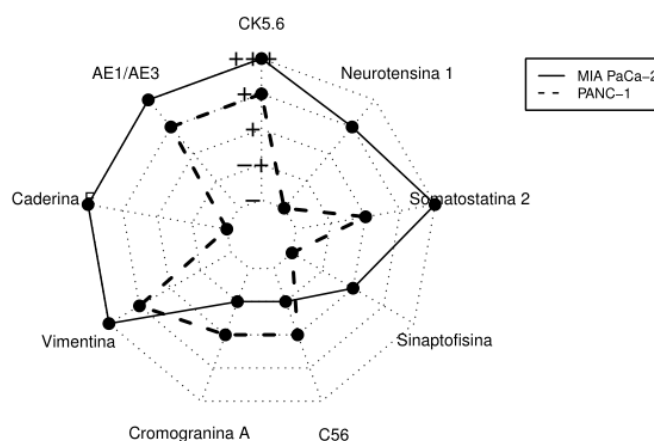


Gráfico 1 - Marcadores imunohistoquímicos das células grandes das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).

O Gráfico 2 apresenta os resultados comparativos entre as duas linhas celulares para as pequenas células.

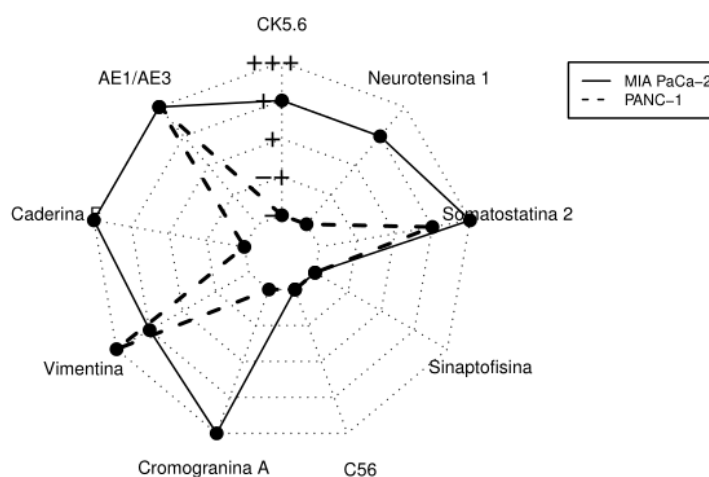


Gráfico 2 - Marcadores imunohistoquímicos das células pequenas das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).

Ao observar os Gráficos 1 e 2 constatamos que também os perfis imunohistoquímicos nas linhas MIA PaCa-2 e PANC-1 são diferentes.

5.1.2. Citometria de fluxo

A imunofenotipagem das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 revelou diferenças no padrão morfológico à microscopia óptica e imunohistoquímico.

O uso da citometria de fluxo pretendia esclarecer se, em termos morfológicos, existiriam de facto duas populações celulares na linha MIA PaCa-2 e três populações celulares na linha PANC-1.

Ao mesmo tempo a técnica foi também utilizada para caracterizar as linhas em causa quanto à presença de marcadores de células estaminais pancreáticas, como o CD24, o CD44, o CD133/1 e o CD326 (ESA).

A análise dos resultados da linha celular MIA PaCa-2 demonstraram, quando observadas as células em *dot plot* FSC/SSC, a presença de três grupos de células (Fig. 4A): a população vermelha (P1), a população verde (P2) e a população azul (P3), o que suporta a possibilidade de estarmos perante uma linha celular polimórfica. Obtivemos um total de 20 000 eventos, com a população P1 a representar 2 539 eventos, o que corresponde a 12,7% das células da amostra.

A população P1, mais pequena em tamanho, e com menor complexidade, mostrou positividade com o marcador de morte celular 7AAD (Fig. 4B). A presença deste marcador confirma que este grupo de células MIA PaCa-2 era composto por células não viáveis, representadas pelo subgrupo vermelho (P1), e que as populações P2 (de cor verde, e que corresponde às células pequenas) e a população P3 (a azul, e que corresponde às células grandes), que foram negativas para este marcador, serão constituídas por células viáveis.

O estudo da expressão dos marcadores de células estaminais pancreáticas CD24 PE (Fig. 4C), CD44 PerCP/Cy5.5 (Fig. 4D), CD133/1 APC (Fig. 4E) e CD326 PE-Cy7 (Figs. 4F e 4G) nas células viáveis, a população P2 (verde) e população P3 (azul)

demonstrou ausência de expressão para o CD24 (CD24⁻), positividade para o CD44 (CD44⁺) e ausência de expressão para o CD133/1 (CD133/1⁻).

Todavia, a população de células grandes (P3), de cor azul, apesar de ser em menor número (percentagem menor) demonstrou uma maior expressão de CD44, representada por CD44⁺⁺ com uma MFI de 70.9, relativamente à população de células pequenas, de cor verde, que apesar de ser maior em percentagem demonstrava ter uma menor expressão de CD44, representada por CD44⁺, e uma MFI inferior de 32.9 (Fig. 4D). A experiência foi repetida usando o mesmo marcador CD 44 conjugado com outro fluorocromo (APC) (Fig. 4H) e o resultado foi semelhante.

Também no que diz respeito à expressão do CD326 podemos observar na Fig. 4F que a população azul não expressa CD326 (CD326⁻), e na Fig. 4G que parte da população verde não expressa o marcador (CD326⁻) e outra parte sim (CD326⁺). Assim, podemos identificar que a população P3 (azul) tem um fenótipo CD24⁻, CD44⁺⁺, CD326⁻ e CD133/1⁻, e que a população verde tem um fenótipo CD24⁻, CD44⁺, CD326^{-/+} e CD133/1⁻. Assim verificamos que as subpopulações da linha celular MiaPaca 2, P2 (verde) e P3 (azul) são fenotipicamente distintas.

Na Fig. 4I podemos observar a relação entre o CD44 e o CD326 e a distribuição da população de células viáveis (P2 e P3) MIA PaCa-2 pelos quatro fenótipos possíveis: Q1, Q2, Q3 e Q4. O fenótipo Q1, evidenciado a azul, é identificado como CD44⁻ e CD326⁺ e representa 6,9% da totalidade das células. O fenótipo Q2, evidenciado a roxo, é identificado como CD44⁺ e CD326⁺ e representa 35,5% da totalidade das células. O fenótipo Q3, evidenciado a castanho, é identificado como CD44⁻ e CD326⁻ e representa 9,6% da totalidade das células. Finalmente, o fenótipo Q4, evidenciado a verde, é identificado como CD44⁺ e CD326⁻ e representa 48% da população. Há um predomínio dos fenótipos CD44⁺ CD326⁻ (48%) e CD44⁺ CD326⁺ (35,5%).

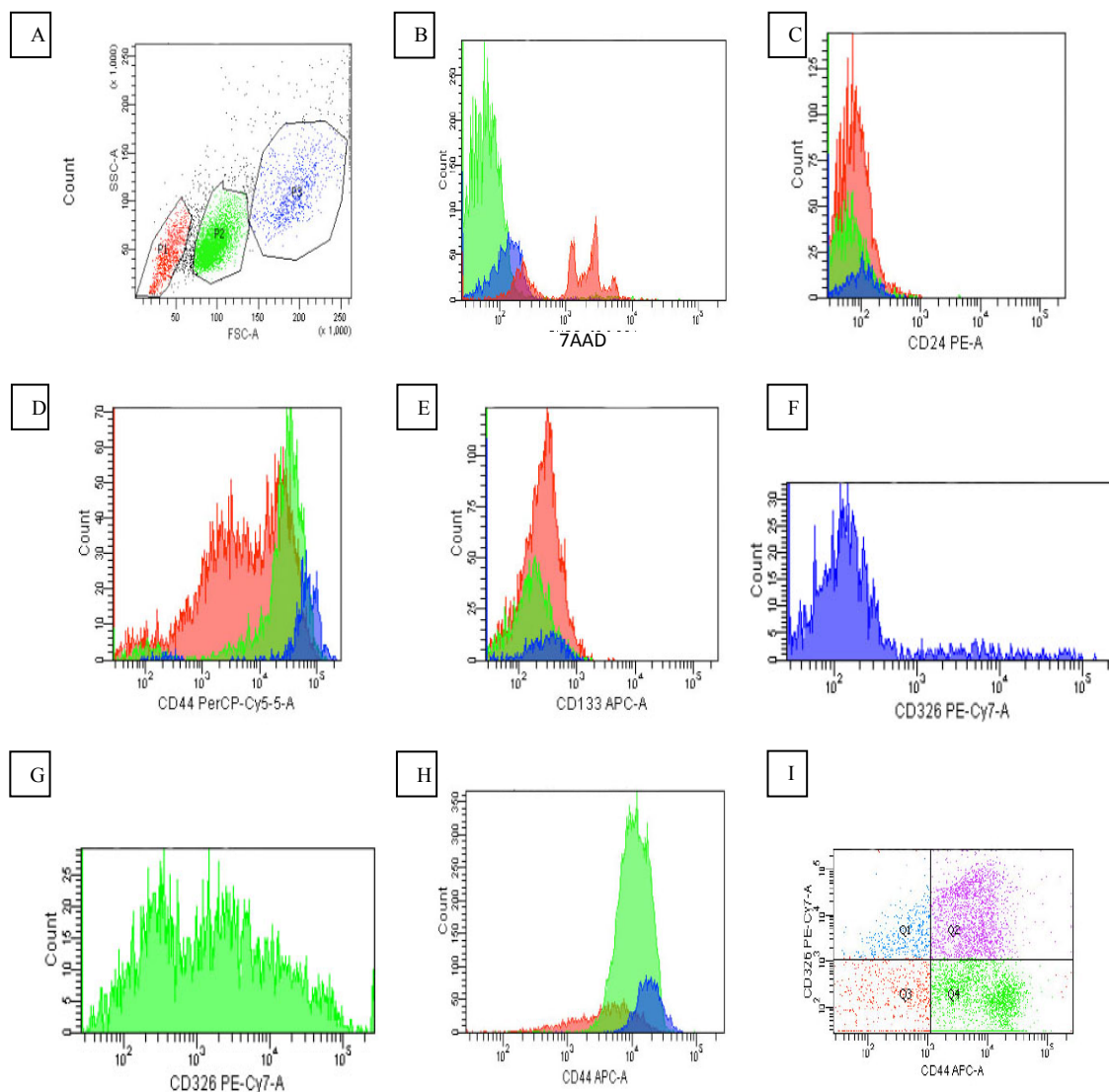


Figura 4 - Representação gráfica da análise por citometria de fluxo da morfologia e da expressão dos marcadores de células estaminais nas células tumorais de MIA PaCa-2. **A:** Dot Plot FSC/SSC representativo das populações P1 (vermelho), P2 (verde) e P3 (azul) ; **B:** Histograma representativo da expressão de 7AAD nas 3 supopulações P1, P2 e P3; **C:** Histograma representativo da expressão de CD24⁻ nas 3 supopulações P1, P2 e P3; **D:** Histograma representativo da expressão de CD44^{+/+} nas 3 supopulações P1, P2 e P3; **E:** Histograma representativo da expressão de CD133/1⁻ nas 3 supopulações P1, P2 e P3; **F:** Histograma representativo da expressão de CD326⁻ na subpopulação P3 (azul); **G:** Histograma representativo da expressão de CD326⁺ na subpopulação P2 (verde); **H:** Histograma representativo da expressão de CD44 nas subpopulações de células grandes (azul) (CD44^{+/+}) e pequenas (verde) (CD44⁺); **I:** Expressão CD44/CD326.

Quando realizámos o mesmo estudo de citometria de fluxo na linha celular PANC-1 constatámos que, enquanto na microscopia ótica e na imunohistoquímica se observavam três populações distintas na sua morfologia, a análise do *dot plot* FSC/SSC

por citometria de fluxo revelou a existência de apenas uma população (P1) de células viáveis. Efetivamente, em 10 000 eventos foi obtida a população P1 (Fig. 5A), com 6 888 eventos, correspondentes a 68,9% do total de células, o que suporta a possibilidade de estarmos perante uma linha celular pleomórfica.

Para estudar a presença de células estaminais pancreáticas na população P1, usámos os marcadores CD24 FITC, CD44 APC, CD133/1 PE e CD326 PE-Cy7 e considerámos as *gates* P2, P3, P4 e P5. P2 corresponde à sub-população que expressa CD24 (Fig. 5B), representa 23,4% da população P1 e tem uma MFI de 3 502. P3 corresponde à sub-população que expressa CD133/1 (Fig. 5C), representa 0,7% da população P1 e tem uma MFI de 3 324. P4 corresponde à sub-população que expressa CD326 (Fig. 5D), representa 49,1% da população P1 e tem uma MFI de 2 068. Finalmente, P5 corresponde à sub-população que expressa CD44 (Fig. 5E) representa 92,3% da população P1 e tem uma MFI de 1 186.

As células PANC-1 apresentam, de acordo com estes resultados, o fenótipo CD24⁻, CD44⁺, CD326^{-/+} e CD133/1⁻.

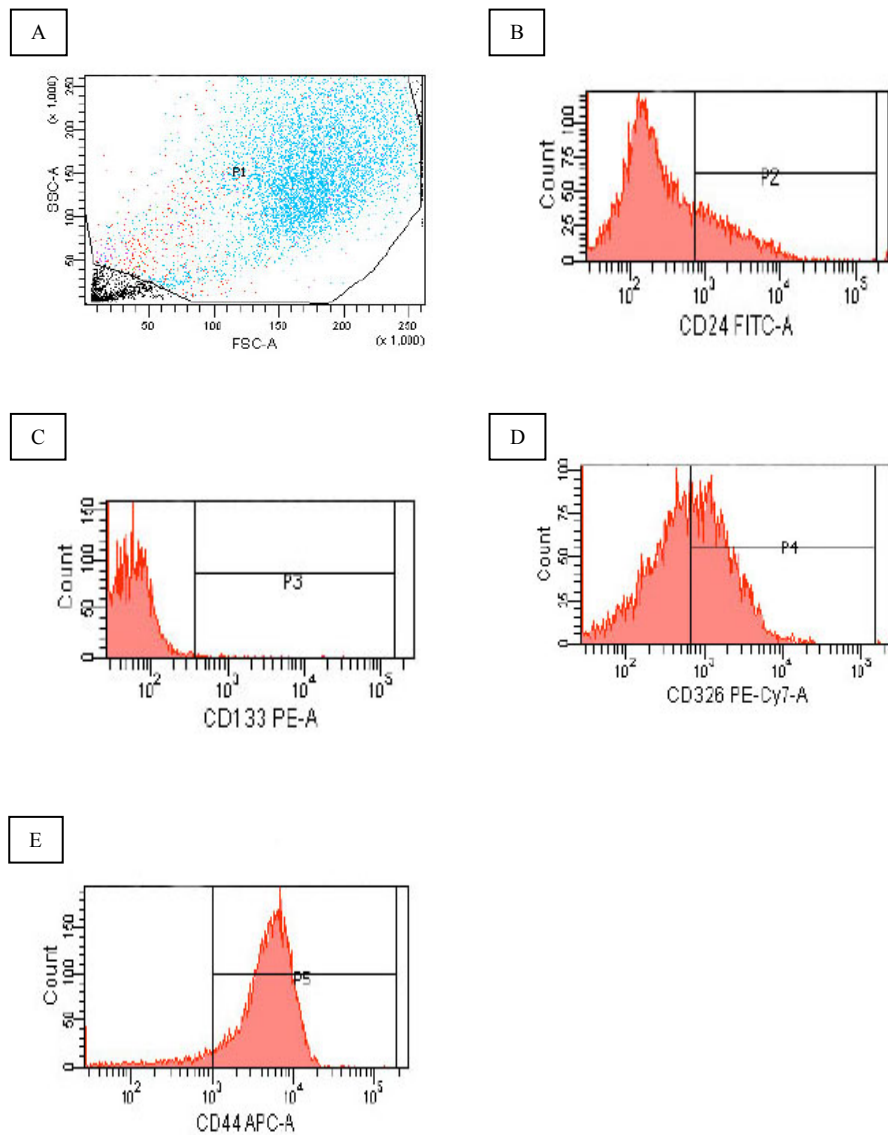


Figura 5 - Representação gráfica da análise por citometria de fluxo da morfologia e da expressão dos marcadores de células estaminais nas células tumorais de PANC-1. **A:** Dot Plot FSC/SSC representativo das população P1 (azul); **B:** Representação gráfica da expressão de CD24+ na população P1; **C:** Representação gráfica da expressão de CD133/1- na população P1; **D:** Representação gráfica da expressão de CD326+na população P1; **E:** Representação gráfica da expressão de CD44+na população P1.

5.2. Perfil genético das linhas celulares

KRAS

Para o gene *KRAS* estudaram-se três codões, o codão 12, o codão 13 e o codão 61. Recorrendo ao método de sequenciação, foi possível verificar que a linha celular MIA PaCa-2 apresenta (Fig. 6) uma mutação *missense*, sem heterozigotia, no codão 12, p.G12C, com substituição do aminoácido glicina pelo aminoácido cisteína, devido à transversão de uma guanina (G) por uma timina (T), GGT>TGT (Fig. 6). A sequência normal foi identificada no *GenBank*: NG_007524.1. Não se detetaram mutações nos codões 13 e 61.

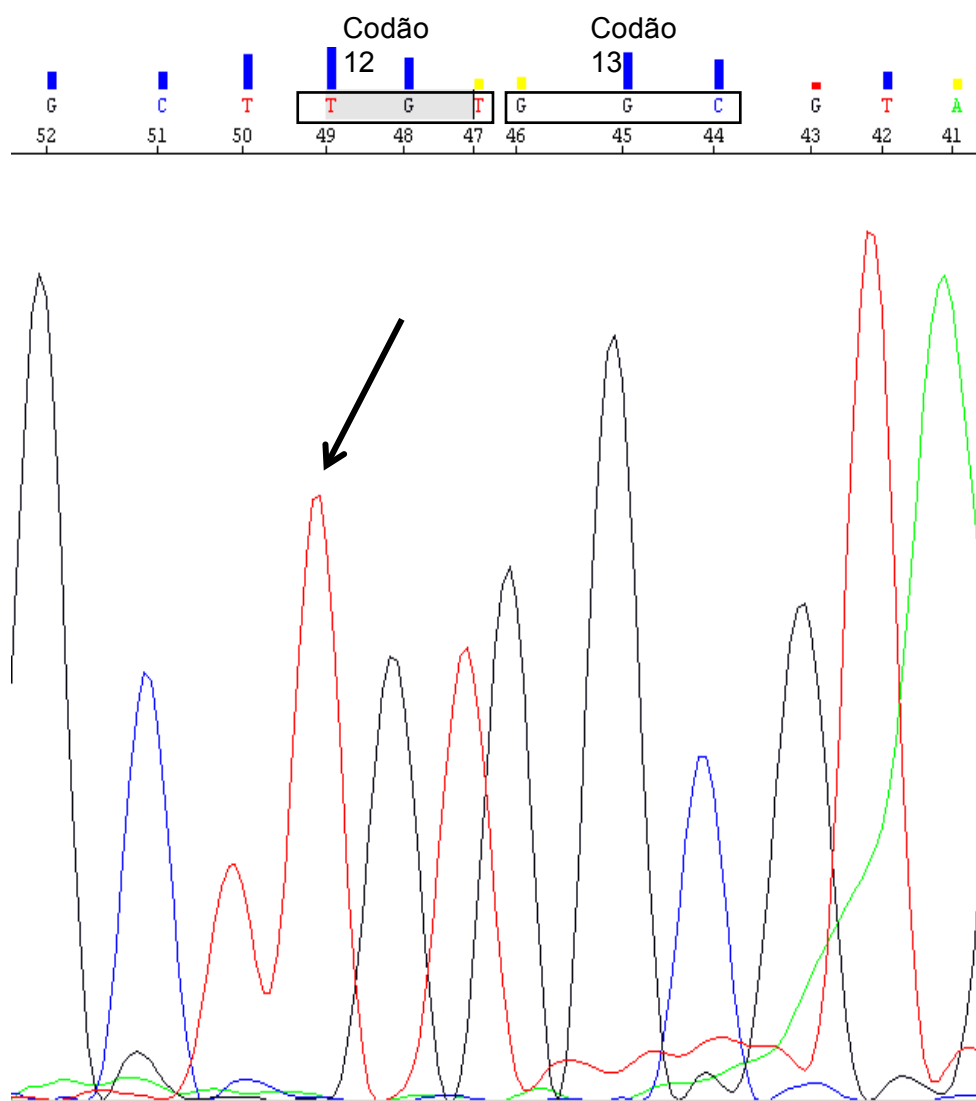


Figura 6 - Eletroferograma de sequenciação correspondente ao codão 12 e 13 do gene *KRAS* na linha celular MIA PaCa-2. A seta assinala o ponto de homozigotia da mutação do codão 12.

A linha celular PANC-1 também apresentou (Fig. 7) uma mutação *missense* no codão 12, com substituição da glicina pelo ácido aspártico, em heterozigotia, devido à transição de uma guanina por uma adenina (A) (p.G12D; GGT>GAT) (Fig. 6). A sequência normal foi identificada no *GenBank*: NG_007524.1. Não se identificaram mutações nos codões 13 e 61.

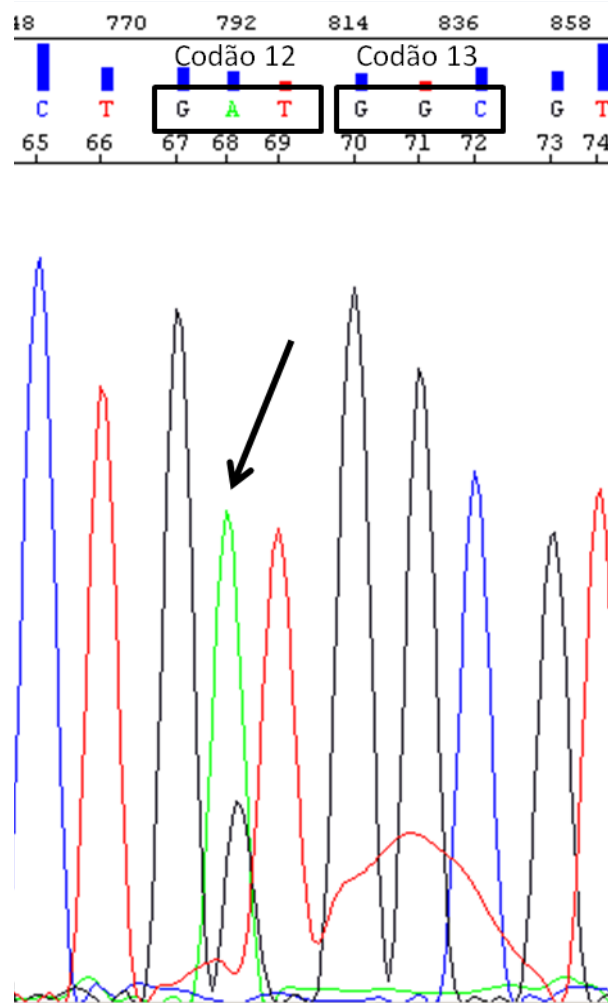


Figura 7 - Eletroferograma de sequencição correspondente ao codão 12 e 13 do gene *KRAS* na linha celular PANC-1. A seta assinala o ponto de heterozigotia da mutação do codão 12.

CDKN2A/p16^{INK4A}

A amplificação dos exões 1-3 do gene *CDKN2A/p16^{INK4A}* permitiu identificar a existência de uma deleção em homozigotia, incluindo os três exões, em ambas as linhas celulares (Fig. 8).

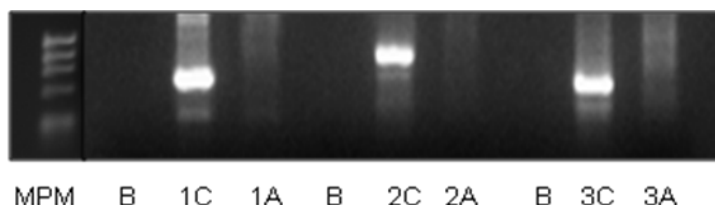


Figura 8 - Resultado da eletroforese dos produtos de amplificação dos exões 1, 2 e 3 do gene *CDKN2A/p16^{INK4A}*, para a linha celular MIA PaCa-2. A letra B corresponde aos controles de contaminação, sem ADN (branco), a letra C corresponde a amostras normais, utilizadas como controles positivos, a letra A corresponde às amostras da linha celular e os algarismos correspondem ao número do exão amplificado, de 1 a 3. MPM - marcador de peso molecular ϕ X174 DNA-HaeIII.

TP53

Relativamente aos cinco exões do gene *TP53* analisados (4, 5, 6, 7 e 8), considerados como “*hot spot*” de mutações, apenas foram encontradas mutações em três destes exões. A linha celular Mia PaCa-2 apresentou uma mutação *missense* sem heterozigotia, no exão 7, com substituição da arginina na posição 248 por triptofano (p.R248W), devido à transição de uma citosina (C) por uma timina (T) (CGG>TGG) (Fig. 9). A sequência normal foi identificada no *GenBank*: U94788.1).

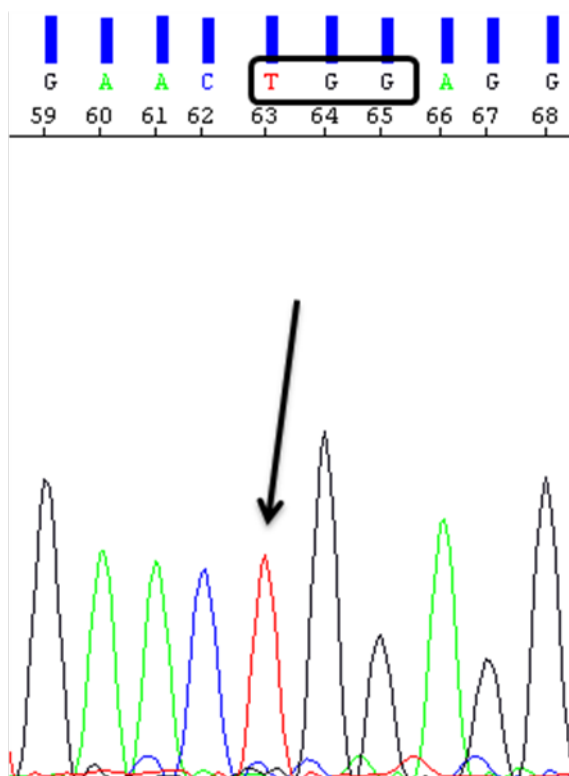


Figura 9 - Eletroferograma de sequenciação do exão 7 do gene *TP53* correspondente à linha celular MIA PaCa-2. A seta representa o local de mutação.

A linha celular PANC-1 revelou duas variações *missense* em dois exões distintos: uma no exão 4, com substituição da prolina na posição 72 por uma arginina (p.P72R) devido à transversão de uma citosina por uma guanina (CCC>CGC) (Fig. 10), e outra no exão 8, com substituição da arginina na posição 273 por uma histidina (p.R273H), por transição de uma guanina por uma adenina (CGT>CAT) (Fig. 11). A sequência normal foi identificada no *GenBank*: U94788.1).

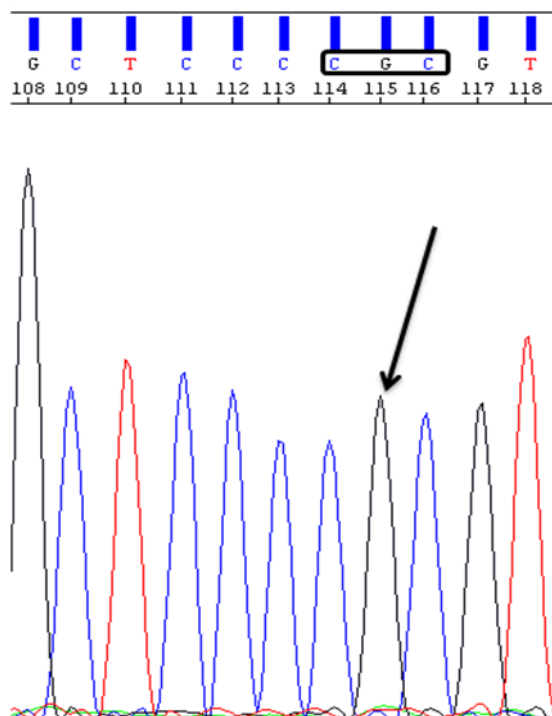


Figura 10 - Eletroferograma de sequenciação do exão 4 do gene *TP53* correspondente à linha celular PANC-1. A seta representa o local de substituição, verificando-se não existir heterozigotia.

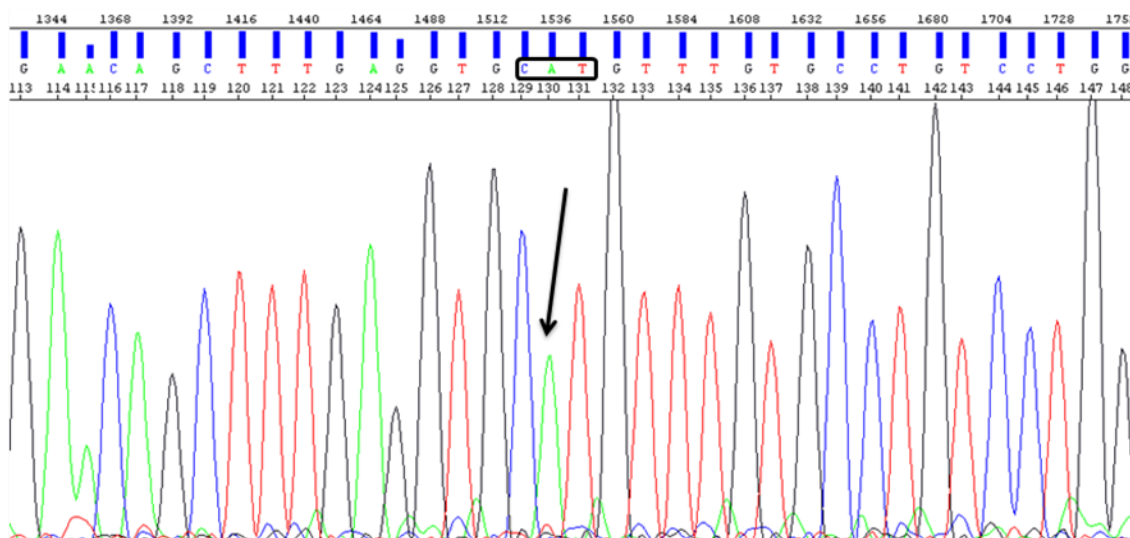


Figura 11 - Eletroferograma de sequenciação do exão 8 do gene *TP53* correspondente à linha celular PANC-1. A seta representa o local de substituição, verificando-se não existir heterozigotia.

A ausência de heterozigotia foi atribuída a deleção do alelo normal (fenómeno de perda de heterozigotia frequente nos genes supressores tumorais).

SMAD4/DPC4

Foram amplificados e sequenciados os 11 exões do gene *SMAD4/DPC4*, não se tendo identificado qualquer mutação em nenhuma das linhas celulares.

Instabilidade de microssatélites

A análise comparativa dos perfis obtidos com as amostras das linhas celulares e com o controlo normal, não identificou o fenómeno de instabilidade de microssatélites (Fig. 12 e Fig. 13).

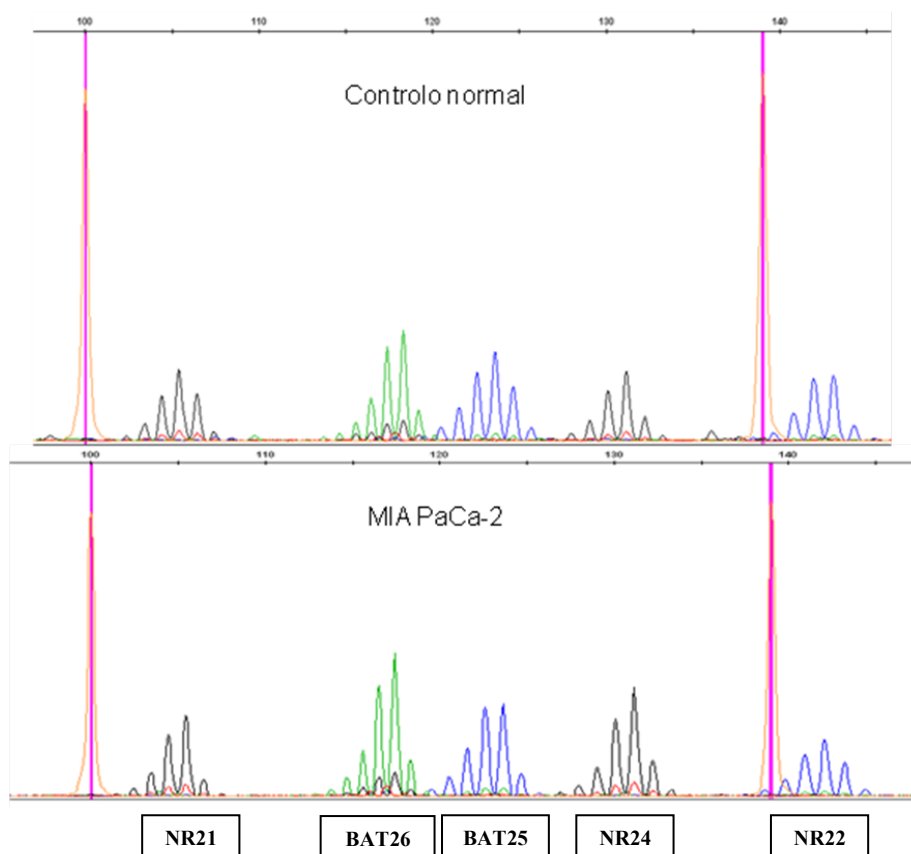


Figura 12 - Comparação entre os resultados da análise de fragmentos para os cinco microssatélites utilizados na amostra controlo e na amostra tumoral da linha celular MIA PaCa-2.

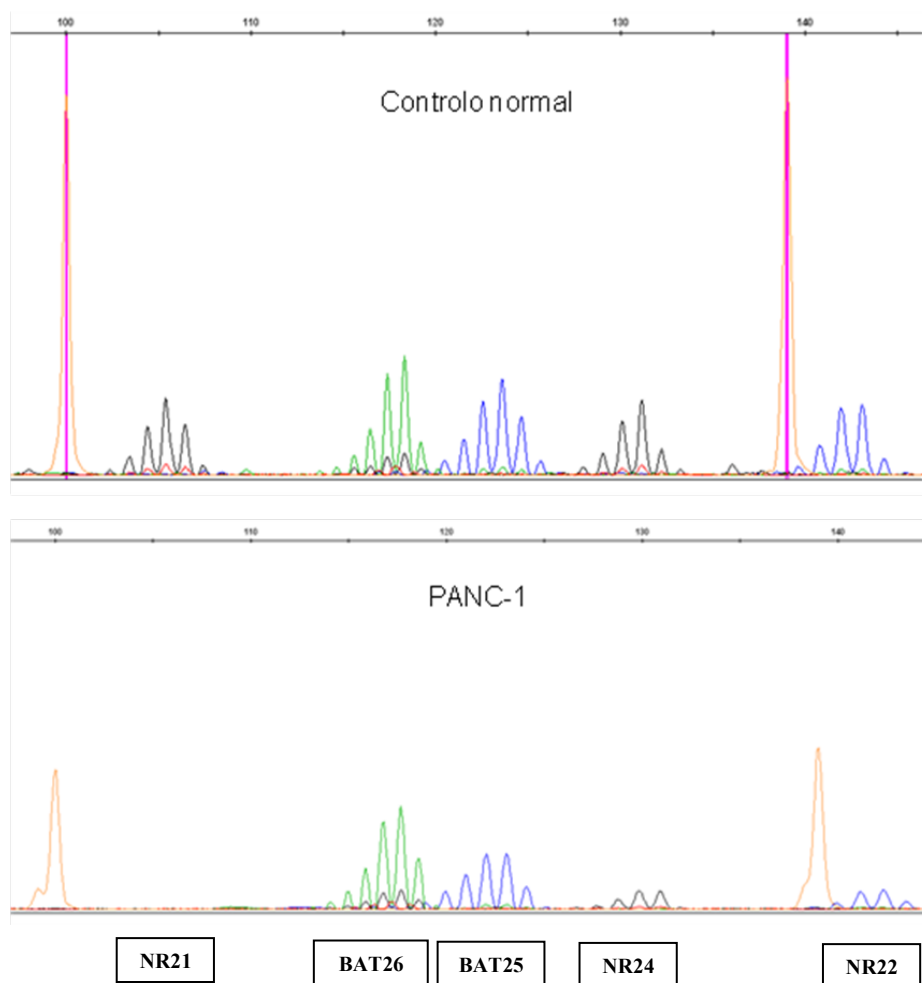


Figura 13 - Comparação entre os resultados da análise de fragmentos para os cinco microssatélites utilizados na amostra controlo e na amostra tumoral da linha celular PANC-1.

Na linha PANC-1 verificou-se ausência de amplificação para o microssatélite NR21, atribuído a provável deleção em homozigotia.

5.3. Estudos de captação com análogos da somatostatina

O Gráfico 3 ilustra os estudos de captação com ^{99m}Tc -Tektrotyde (^{99m}Tc -TOC), ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE na linha MIA PaCa-2.

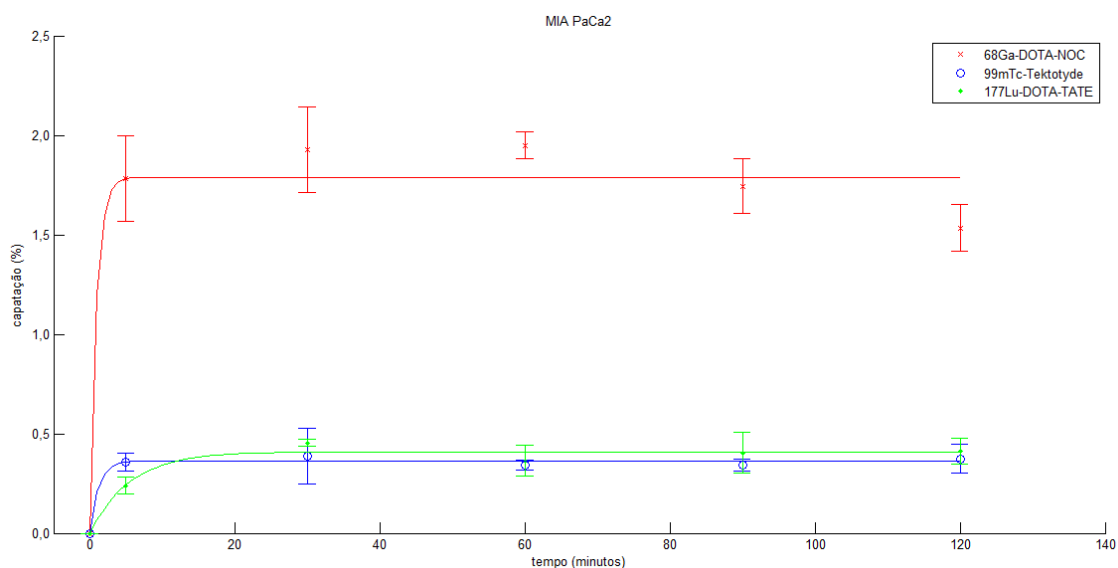


Gráfico 3 - Captação do ^{99m}Tc -Tektrotyde (^{99m}Tc -TOC), ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE ao longo do tempo pelas células da linha MIA PaCa-2. Na figura encontram-se representadas as médias dos valores obtidos em cada instante, juntamente com o desvio padrão. As linhas representam linhas de tendência, traduzidas pela função exponencial $y = A (1 - e^{-\lambda t})$, em que A traduz o máximo de captação atingido e λ é uma constante relacionada com a velocidade de captação.

Na Tabela 15, mostram-se os valores e respectivos intervalos de confiança das constantes A e λ da função, $y = A (1 - e^{-\lambda t})$, que foi usada para ajustar os valores experimentais. A constante A tem unidades de percentagem de captação e representa a máxima captação teórica dada pelo modelo, já a constante λ tem unidades de inverso de tempo (min^{-1}) e está associada à velocidade de rapidez a que se dá a captação.

Tabela 15 - Valores e intervalos de confiança das constantes A e λ nos estudos de captação da linha MIA PaCa-2

Molécula marcada	A	λ	R^2
^{99m}Tc -TOC	0,36 IC95% [0,34;0,39]	0,86 IC95% [-1,53;3,23]	0,99
^{68}Ga -DOTA-NOC	1,79 IC95% [1,56;2,02]	1,11 IC95% [-13,95;16,18]	0,96
^{177}Lu -DOTA-TATE	0,41 IC95% [0,36;0,46]	0,18 IC95% [0,07;0,26]	0,97

IC - Intervalo de confiança

O Gráfico 4 ilustra os estudos de captação com ^{99m}Tc -Tektrotyde (^{99m}Tc -TOC), ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE na linha PANC-1, observando-se uma maior captação do ^{68}Ga -DOTA-NOC.

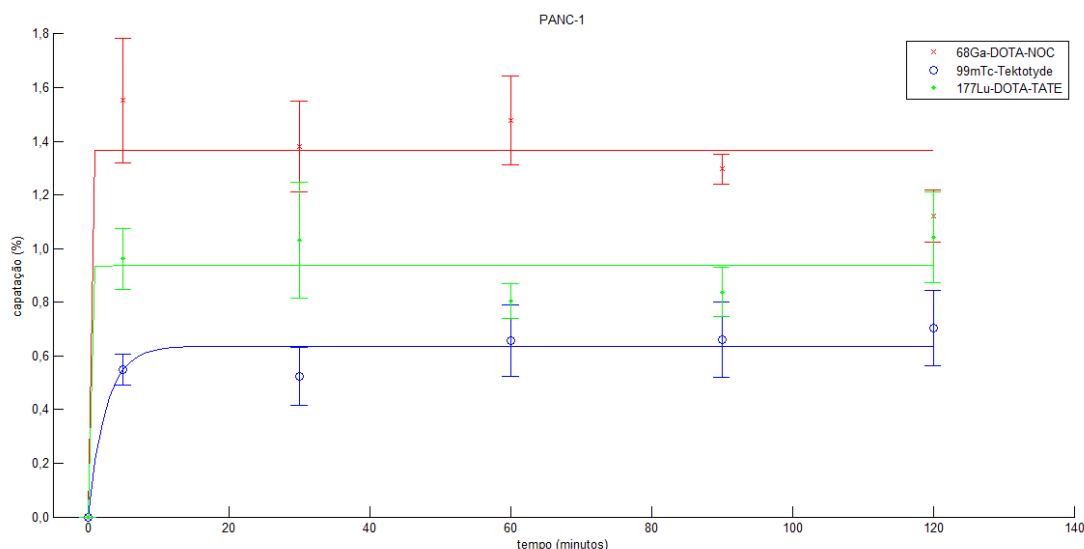


Gráfico 4 - Captação do ^{99m}Tc -Tektrotyde (^{99m}Tc -TOC), ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE ao longo do tempo pelas células da linha PANC-1. Na figura encontram-se representadas as médias dos valores obtidos em cada instante, juntamente com o desvio padrão. As linhas representam linhas de tendência, traduzidas pela função exponencial $y = A(1 - e^{-\lambda t})$, em que A traduz o máximo de captação atingido e λ é uma constante relacionada com a velocidade de captação.

Na Tabela 16, mostram-se os valores e respectivos intervalos de confiança das constantes A e λ da função, $y = A(1 - e^{-\lambda t})$, que foi usada para ajustar os valores experimentais. A constante A tem unidades de percentagem de captação e representa a máxima captação teórica dada pelo modelo, já a constante λ tem unidades de inverso de tempo (min^{-1}) e está associada à velocidade de rapidez a que se dá a captação.

Tabela 16 - Valores e intervalos de confiança das constantes A e λ nos estudos de captação da linha PANC-1

Molécula marcada	A	λ	R^2
^{99m}Tc -TOC	0,64 IC95% [0,54;0,73]	0,40 IC95% [-0,08;0,87]	0,95
^{68}Ga -DOTA-NOC	1,37 IC95% [1,13;1,60]	4,00 IC95% #	0,93
^{177}Lu -DOTA-TATE	0,94 IC95% [0,78;1,09]	3,64 IC95% #	0,94

#Não foi possível apurar o intervalo de confiança (IC) devido a problemas associados à técnica automática de otimização.

Também nestes caso se pode observar que a percentagem de captação é significativamente superior para a molécula ^{68}Ga -DOTA-NOC, comparativamente às restantes.

5.4. Estudo dos recetores de somatostatina

O Gráfico 5 ilustra a distribuição (*box plot*) dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 na linha celular MIA PaCa-2, constatando-se que todos os recetores estão presentes, existindo uma maior abundância dos recetores RS1 e RS3.

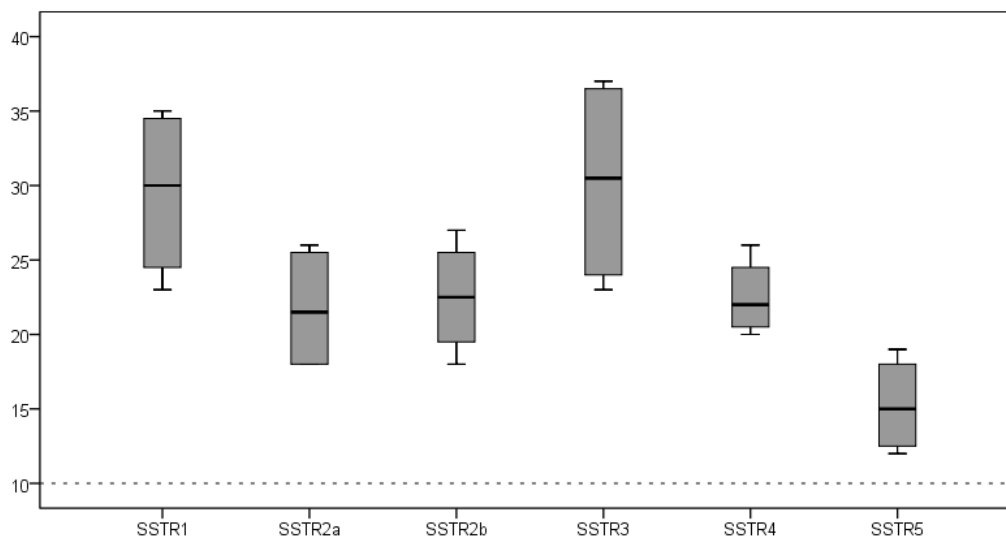


Gráfico 5 - Gráfico 5 - Distribuição dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 nas células da linha celular MIA PaCa-2.

Para testar se os valores obtidos eram superiores a 10, foi realizado a análise univariável da mediana para cada subtipo de recetor. A Tabela 17 representa os valores de p obtidos.

Tabela 17 - Valores de p para a distribuição dos recetores da somatostatina na linha MIA PaCa-2

SSTR1	SSTR2a	SSTR2b	SSTR3	SSTR4	SSTR5
0,034	0,033	0,034	0,034	0,034	0,034

O Gráfico 6 ilustra a distribuição (*box plot*) dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 na linha celular PANC-1,

constatando-se que todos os recetores estão presentes, existindo uma maior abundância dos recetores RS2a e RS5.

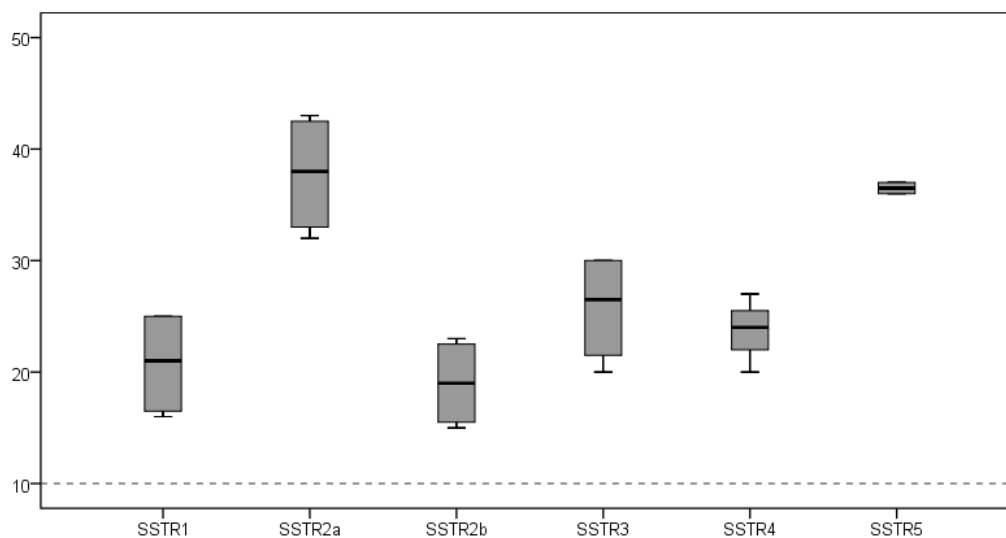


Gráfico 6 - Distribuição dos recetores SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 nas células da linha celular PANC-1.

Para testar se os valores obtidos eram superiores a 10, foi realizado a análise univariável da mediana para cada subtipo de recetor. A Tabela 18 representa os valores de p obtidos.

Tabela 18 - Valores de p para a distribuição dos recetores da somatostatina na linha PANC-1

SSTR1	SSTR2a	SSTR2b	SSTR3	SSTR4	SSTR5
0,033	0,034	0,034	0,033	0,033	0,032

5.5. Modulação celular com citostáticos

Os resultados seguintes ilustram o efeito de várias concentrações de gemcitabina, do 5-fluorouracilo, do everolimus, do docetaxel, e do sunitinib, nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1.

5.5.1. Avaliação da atividade metabólica das células

Para avaliar o efeito dos citostáticos atrás mencionados na atividade metabólica das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1, estudámos o efeito destes fármacos a diferentes concentrações e durante diferentes períodos de incubação, usando o ensaio do MTT. A determinação da dose letal média (IC₅₀) é baseada no ajuste das curvas dose/resposta por uma sigmóide.

Gemcitabina

A Tabela 19 representa a resposta biológica de ambas as linhas celulares à gemcitabina após 24, 48, 72 e 96 horas (h) de incubação. Como pode ser observado na Tabela 18, a gemcitabina não consegue inibir a atividade metabólica de nenhuma das linhas celulares em estudo, após 24 h e 48 h de incubação, para as concentrações testadas. A concentração mais elevada testada foi de 1 000 µM.

Tabela 19 - IC₅₀ das células MIA PaCa-2 e PANC-1 após incubação com gemcitabina

Período de incubação (h)	MIA PaCa-2		PANC-1	
	IC ₅₀ (µM)	r ²	IC ₅₀ (µM)	r ²
24	#	--	#	--
48	#	--	#	--
72	657,31	0,98	216,45	0,98
96	0,02	0,99	483,07	0,91

Os valores experimentais de proliferação não permitiram a determinação do IC₅₀

O Gráfico 7 representa as curvas dose-resposta para as 72h e 96 h de incubação, para a gemcitabina, na linha MIA PaCa-2.

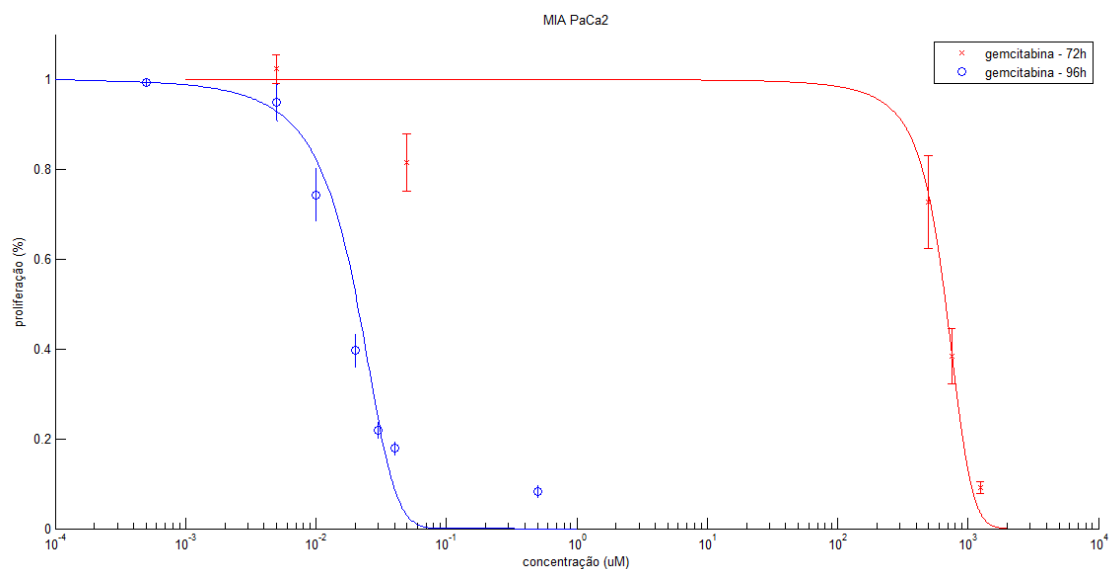


Gráfico 7 - Curvas dose/resposta, em gráfico semi-logarítmico, para a gemcitabina, com tempos de incubação de 72 h e 96 h, na linha MIA PaCa2.

O Gráfico 8 representa as curvas-dose resposta em função do tempo, para as 72 h e 96 h de incubação, para a gemcitabina, na linha PANC-1.

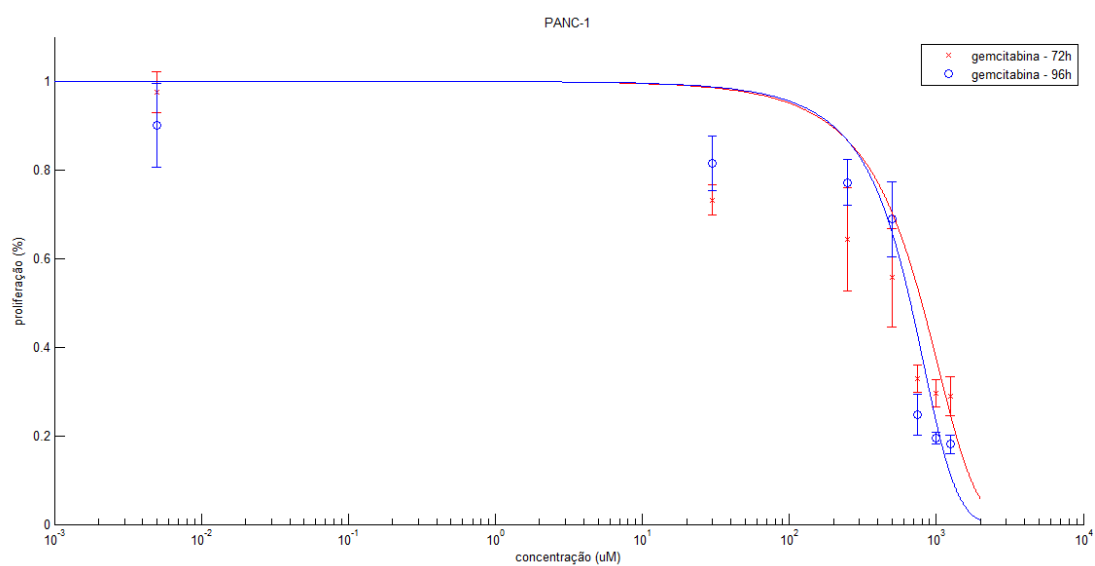


Gráfico 8 - Curvas dose/resposta, em gráfico semi-logarítmico, para a gemcitabina, com tempos de incubação de 72 h e 96 h, na linha PANC-1.

5-Fluorouracilo (5-FU)

No que se refere aos resultados obtidos com o 5-FU (Tabela 20), foi observado que este fármaco não consegue inibir a atividade metabólica de ambas as linhas em estudo após 24 h e 48 h de incubação, para as concentrações testadas. A concentração mais elevada testada foi de 1000 μM .

Tabela 20 - IC₅₀ das células MIA PaCa-2 e PANC-1 após incubação com 5-FU

Período de incubação (h)	MIA PaCa-2		PANC-1	
	IC ₅₀ (μM)	r ²	IC ₅₀ (μM)	r ²
24	#	--	#	--
48	#	--	#	--
72	52,95	0,99	17,73	0,91
96	10,25	0,99	15,76	0,99

Os valores experimentais de proliferação não permitiram a determinação do IC₅₀

O Gráfico 9 representa as curvas dose-resposta em função do tempo, para as 72 h e 96 h de incubação, para o 5-FU, na linha MIA PaCa-2.

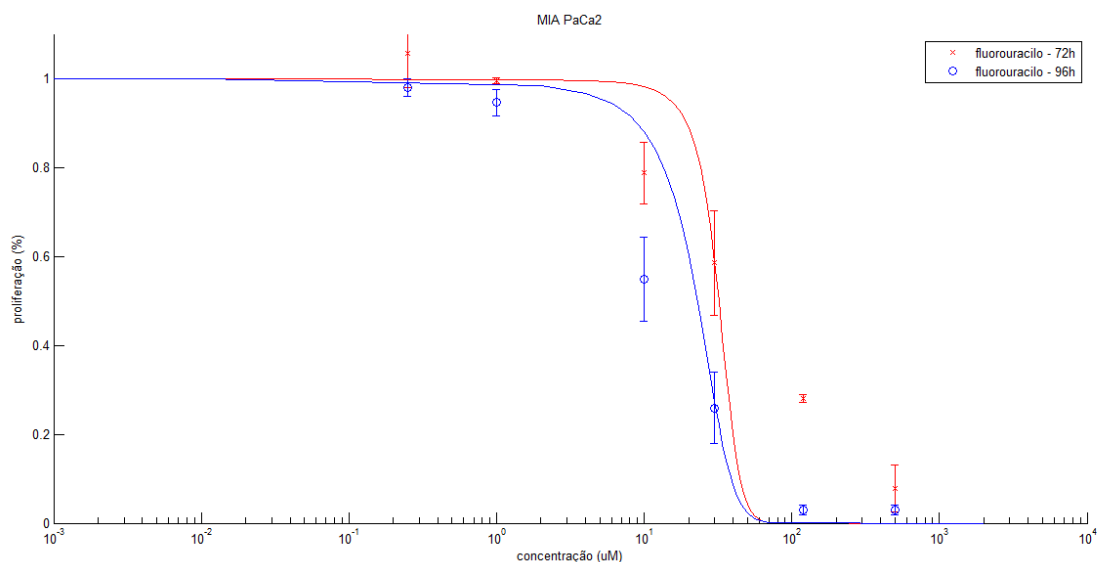


Gráfico 9 - Curvas dose/resposta, em gráfico semi-logarítmico, para o 5-FU, com tempos de incubação de 72 h e 96 h, na linha MIA PaCa 2.

O Gráfico 10 representa as curvas dose-resposta em função do tempo, para as 72 h e 96 h de incubação, para o 5-FU, na linha PANC-1.

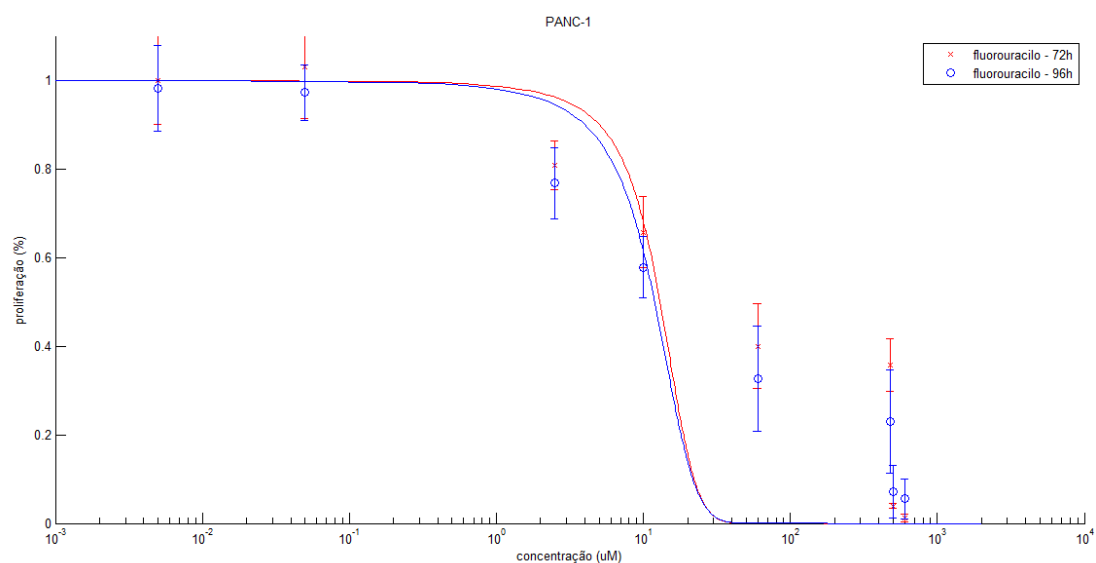


Gráfico 10 - Curvas dose/resposta, em gráfico semi-logarítmico, para o 5-FU, com tempos de incubação de 72 h e 96 h, na linha PANC-1.

Everolimus

A Tabela 21 descreve os valores de IC₅₀ resultantes da incubação das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 com o everolimus.

Tabela 21 - IC₅₀ das células MIA PaCa-2 e PANC-1 após incubação com everolimus

Período de incubação (h)	MIA PaCa-2		PANC-1	
	IC ₅₀ (µM)	r ²	IC ₅₀ (µM)	r ²
24	26,8	0,96	26,79	0,98
48	20,1	0,99	21,06	0,98
72	24,94	0,97	21,56	0,98
96	23,02	0,99	15,95	0,96

O Gráfico 11 representa as curvas dose-resposta em função do tempo para o everolimus, na linha Mia PaCa-2, as quais permitem obter o valor do IC50.

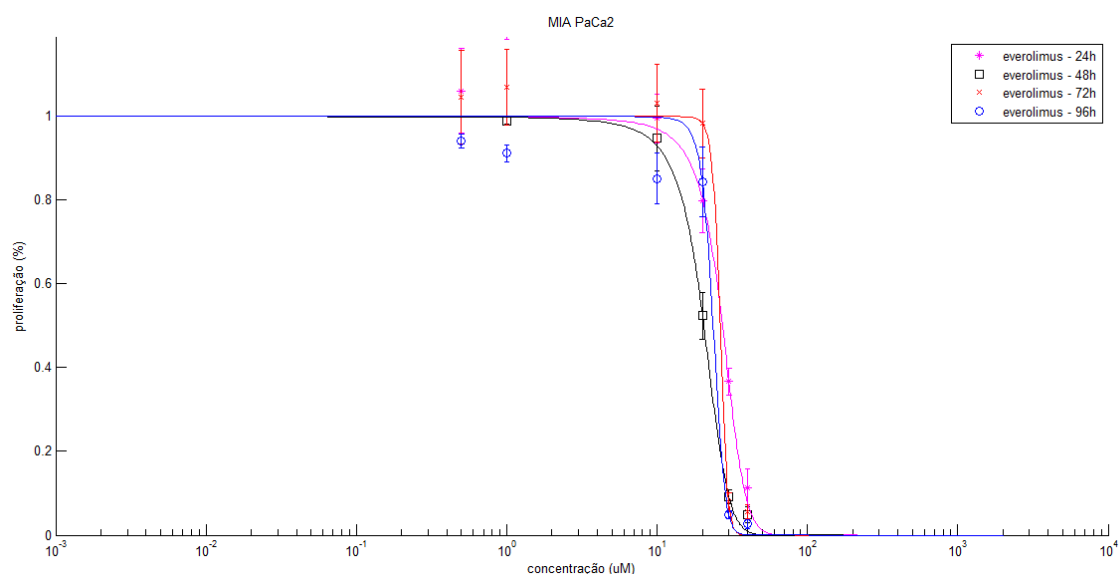


Gráfico 11 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com everolimus para a linha MIA PaCa-2.

O Gráfico 12 representa as curvas dose-resposta em função do tempo para o everolimus na linha PANC-1, as quais permitem obter o valor do IC50.

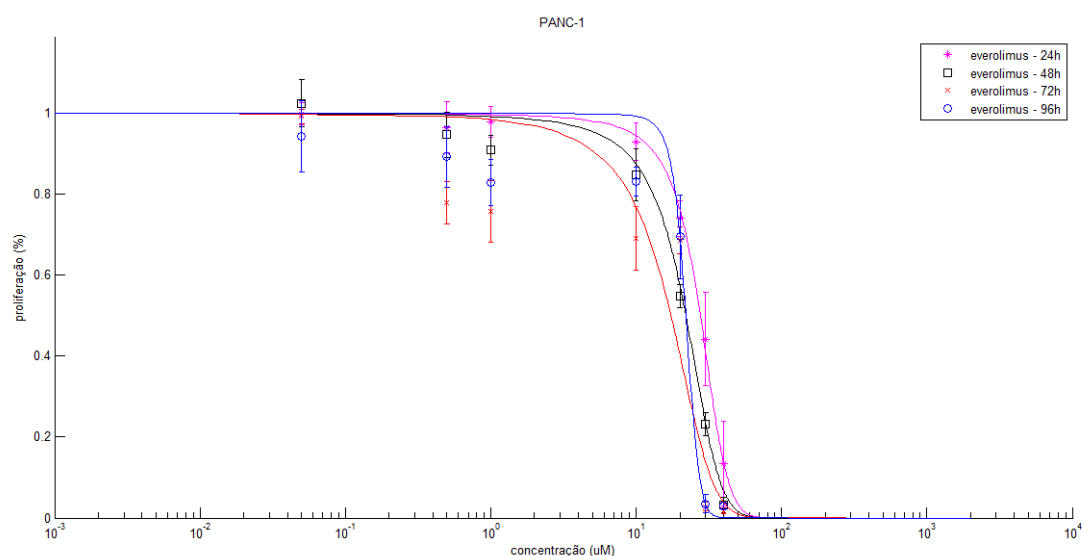


Gráfico 12 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com everolimus para a linha PANC-1.

Sunitinib

A Tabela 22 descreve os valores de IC₅₀ resultantes da incubação das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 com o sunitinib.

Tabela 22 - IC₅₀ das células MIA PaCa-2 e PANC-1 após incubação com sunitinib

Período de incubação (h)	MIA PaCa-2		PANC-1	
	IC ₅₀ (μM)	r ²	IC ₅₀ (μM)	r ²
24	0,53	0,95	11,66	0,99
48	6,83	0,99	15,04	0,99
72	4,53	0,9	7,91	0,99
96	0,75	0,91	14,18	0,99

O Gráfico 13 representa as curvas dose-resposta em função do tempo para o sunitinib, na linha MIA PaCa-2, as quais permitem obter o valor do IC₅₀.

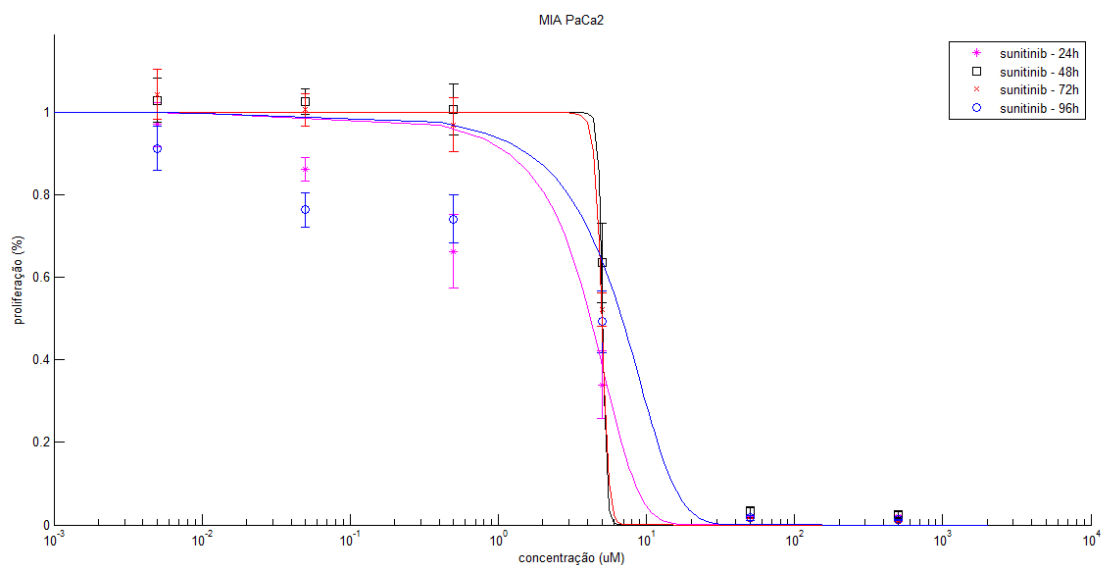


Gráfico 13 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com sunitinib para a linha MIA PaCa2.

O Gráfico 14 representa as curvas dose-resposta em função do tempo para o sunitinib, na linha PANC-1, as quais permitem obter o valor do IC50.

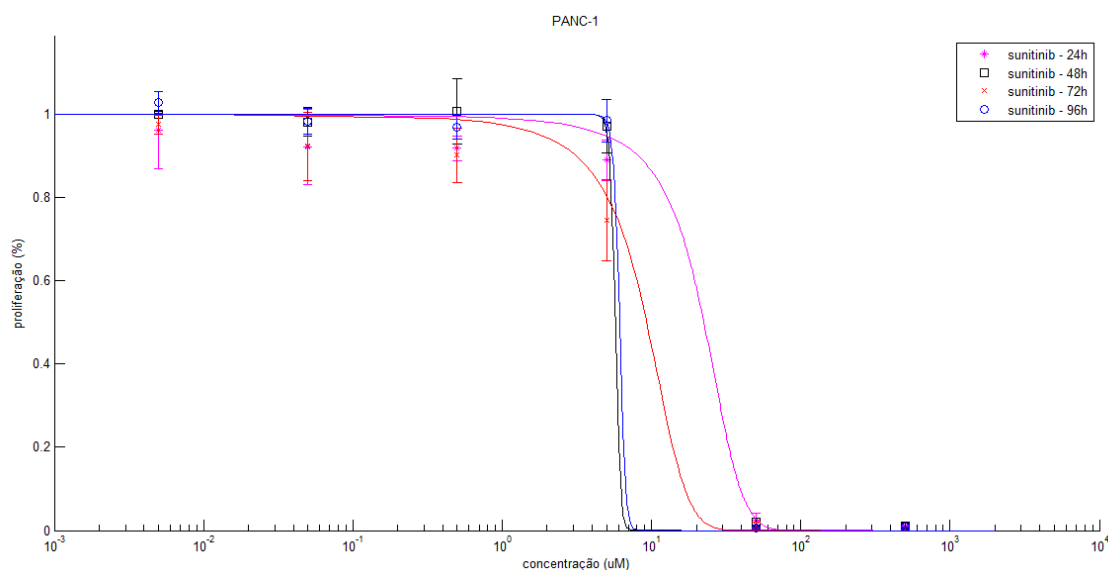


Gráfico 14 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com sunitinib para a linha PANC-1.

Docetaxel

A Tabela 22 descreve os valores de IC50 resultantes da incubação das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 com o sunitinib.

Na Tabela 23, pode observar-se que o IC50 determinado após incubação da linha MIA PaCa-2 com docetaxel decresce progressivamente das 24 h (0,1260 µM) para as 72 h (0,0008 µM). Todavia, ocorre um ligeiro aumento no valor de IC50 (0,0016 µM) após 96 h de incubação com este fármaco. Por outro lado, na linha celular PANC-1, verifica-se que a resposta celular obtida é dependente do tempo e que o valor de IC50 varia entre os 0,2350 µM (após 24 h de incubação) e os 0,0350 µM (após 96 h de incubação).

Tabela 23 - IC₅₀ das células MIA PaCa-2 e PANC-1 após incubação com docetaxel

Período de incubação (h)	MIA PaCa-2		PANC-1	
	IC ₅₀ (μM)	r ²	IC ₅₀ (μM)	r ²
24	0.1260	0.99	0.2350	0.99
48	0.0010	0.99	0.1210	0.99
72	0.0008	0.99	0.0360	0.98
96	0.0016	0.99	0.0350	0.99

O Gráfico 15 representa as curvas dose-resposta em função do tempo para o docetaxel, na linha Mia PaCa-2, as quais permitem obter o valor do IC₅₀.

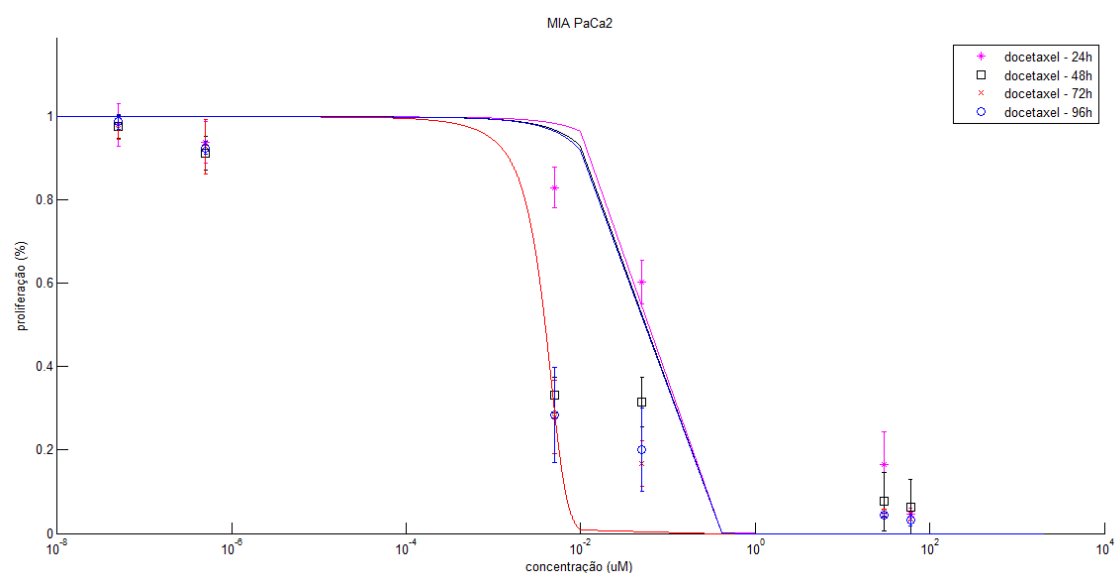


Gráfico 15 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com docetaxel para a linha MIA PaCa2.

O Gráfico 16 representa as curvas dose-resposta em função do tempo para o docetaxel, na linha PANC-1, as quais permitem obter o valor do IC50.

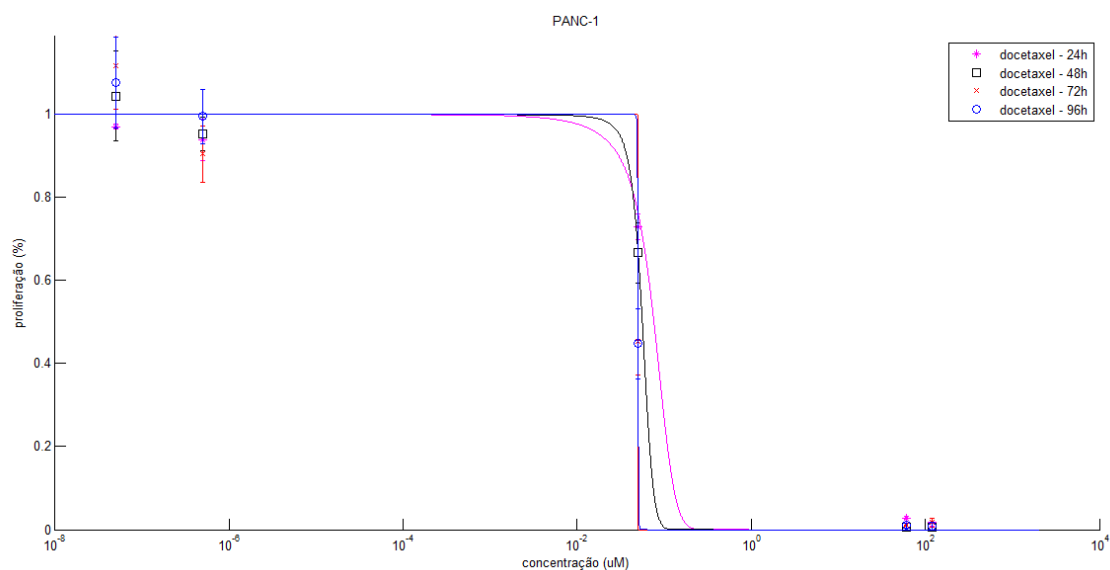


Gráfico 16 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com docetaxel para a linha PANC-1.

5.5.2. Avaliação da viabilidade e da morte celulares

A avaliação da viabilidade e da morte celulares foi efetuada por citometria de fluxo, através da dupla marcação com AV/PI. Esta técnica permite identificar diferentes populações celulares, como as células viáveis (V), as células em apoptose (A), as células em apoptose e necrose (A/N) e as células necróticas (N).

O Gráfico 17 apresenta a análise da viabilidade e da morte celular na linha MIA PaCa-2.

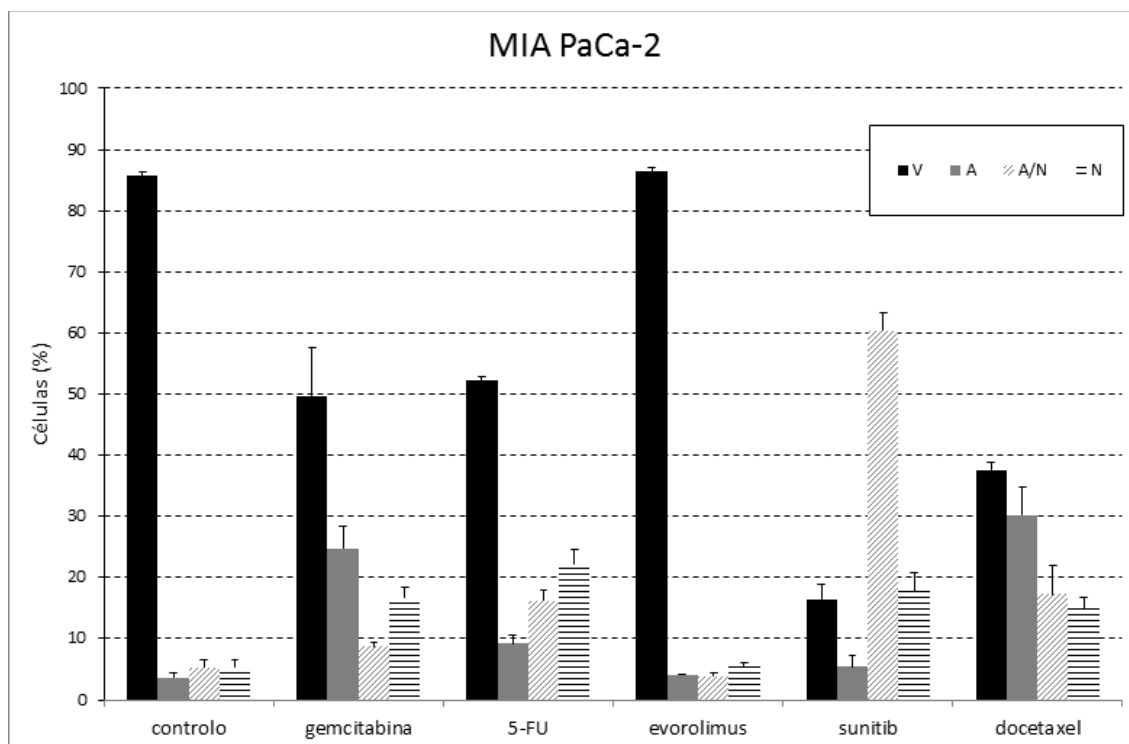


Gráfico 17 - Análise da viabilidade e da morte celulares na linha MIA PaCa-2 por citometria de fluxo, usando a dupla marcação com AV/PI. O gráfico representa a percentagem de células viáveis (V), em apoptose (A), em apoptose/necrose (A/N) e em necrose (N), após 72 h de incubação com as concentrações correspondente aos IC50 calculados para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. Os resultados exprimem a média de 3 experiências independentes, com as colunas representando a média da percentagem e as barras de erro são duas vezes o desvio padrão.

O Gráfico 18 apresenta a análise da viabilidade e da morte celular na linha PANC-

1.

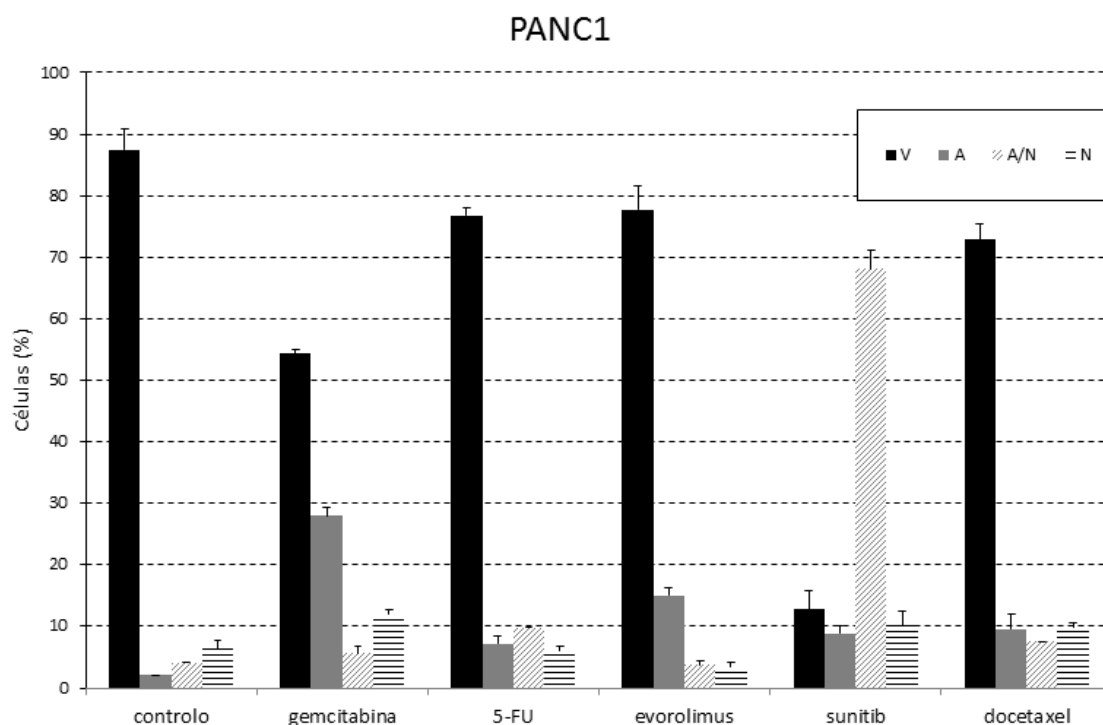


Gráfico 18 - Análise da viabilidade e da morte celulares na linha PANC-1 por citometria de fluxo, usando a dupla marcação com AV/PI. O gráfico representa a percentagem de células viáveis (V), em apoptose (A), em apoptose/necrose (A/N) e em necrose (N), após 72 h de incubação com as concentrações correspondente aos IC50 calculados para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. Os resultados exprimem a média de 3 experiências independentes, com as colunas representando a média da percentagem e as barras de erro são duas vezes o desvio padrão.

Análise estatística

A viabilidade e a morte celulares foram analisadas, considerando as diferenças observadas em cada um dos grupos de células (viáveis, em apoptose, em apoptose/necrose e necróticas), devidas à ação dos fármacos em investigação. Estas diferenças foram avaliadas, em cada linha celular, recorrendo a testes não paramétricos, nomeadamente o teste Kruskal-Wallis, e testes independentes *post-hoc* corrigidos para múltiplas comparações (Dunn-Sidak). As diferenças entre as duas linhas celulares foram também avaliadas usando os testes de Mann-Whitney.

A análise estatística foi realizada usando a plataforma estatística IBM-SPSS v.20 e assumindo 0,05 como nível de significância.

Análise da viabilidade e da morte celulares das células da linha MIA PaCa-2

Os gráficos 19 e 20 demonstram a morte celular, devida à apoptose e à necrose, e a viabilidade correspondente, no que respeita aos diferentes fármacos testados na linha MIA PaCa-2.

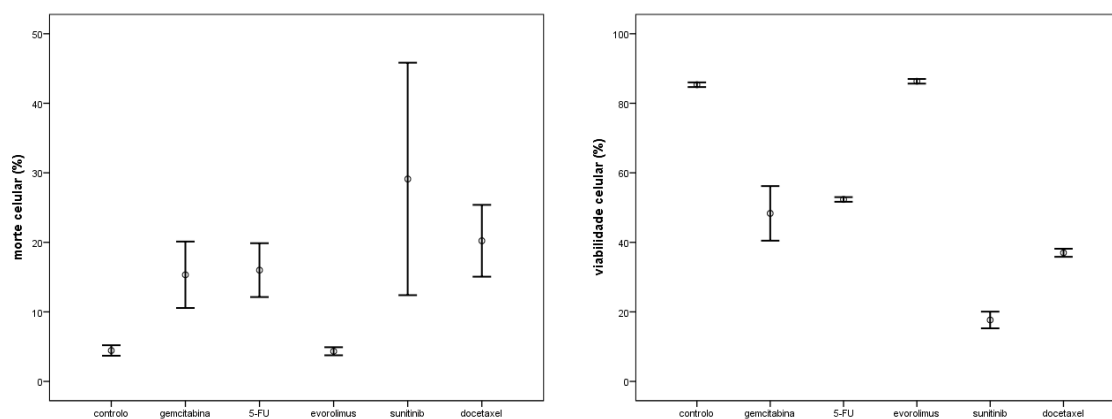


Gráfico 19 - Análise estatística da viabilidade e da morte celulares na linha MIA PaCa-2. O gráfico da esquerda apresenta os resultados da morte celular (%) por apoptose e por necrose, e o gráfico da direita a viabilidade (%), correspondentes ao efeito dos fármacos (gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel) testadas. Cada gráfico representa a média e o intervalo correspondente a duas vezes o erro padrão da média.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 16,070; p = 0,007$) entre os diferentes fármacos no que se refere à percentagem de células viáveis. Ao realizarmos testes *post-hoc* de comparações múltiplas corrigidas, a única diferença detetável registou-se entre o sunitinib e o everolimus. Todavia, sem as comparações múltiplas corrigidas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e as células tratadas com docetaxel ($p = 0,032$), entre o controlo e as células tratadas com sunitinib ($p = 0,005$), entre as células tratadas com sunitinib e as tratadas com everolimus ($p = 0,001$), e entre as células tratadas com docetaxel e as tratadas com everolimus ($p = 0,007$).

No que respeita à percentagem de células não viáveis, em apoptose ou em necrose, existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 35,092; p < 0,001$) entre os fármacos. Realizando testes *post-hoc* com correção para comparações

múltiplas, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ($p = 0,022$), entre o controlo e as células tratadas com 5-FU ($p = 0,010$), entre o controlo e as células tratadas com sunitinib ($p = 0,003$), entre o controlo e as células tratadas com docetaxel ($p = 0,001$), entre as células tratadas com everolimus e com 5-FU ($p = 0,007$), entre as células tratadas com everolimus e com gemcitabina ($p = 0,017$), entre as células tratadas com everolimus e com sunitinib ($p = 0,002$), e entre as células tratadas com everolimus e com docetaxel ($p = 0,001$).

Sem a correção para comparações múltiplas as diferenças encontradas são as mesmas.

Análise da viabilidade e da morte celulares das células da linha PANC-1

Os gráficos seguintes demonstram a morte celular, devida à apoptose e à necrose, e a viabilidade correspondente, no que respeita aos diferentes fármacos testados na linha celular PANC-1.

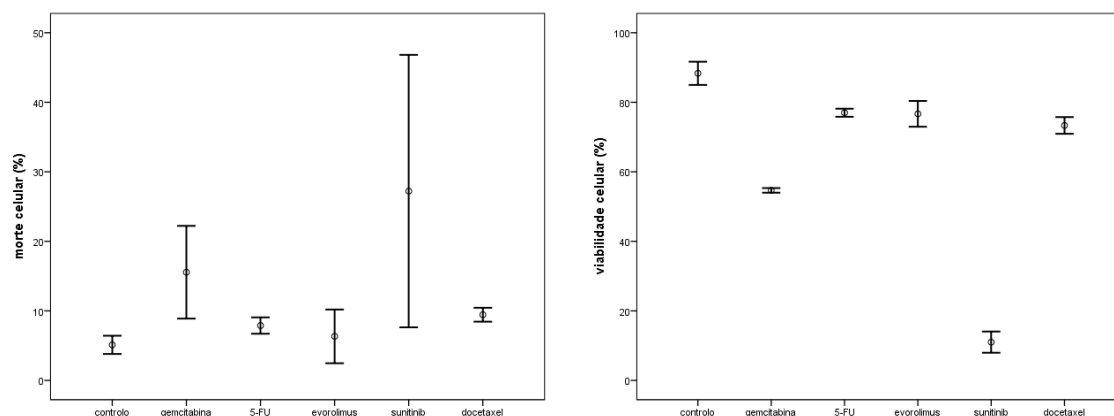


Gráfico 20 - Análise estatística da viabilidade e da morte celulares na linha PANC-1. O gráfico da esquerda apresenta os resultados da morte celular (%) por apoptose e por necrose, e o gráfico da direita a viabilidade (%), correspondentes ao efeito dos fármacos (gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel) testadas. Cada gráfico representa a média e o intervalo correspondente a duas vezes o erro padrão da média.

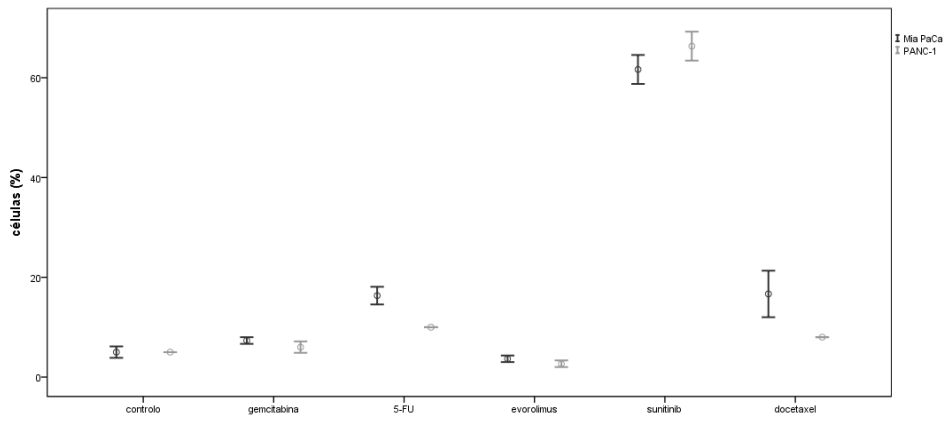
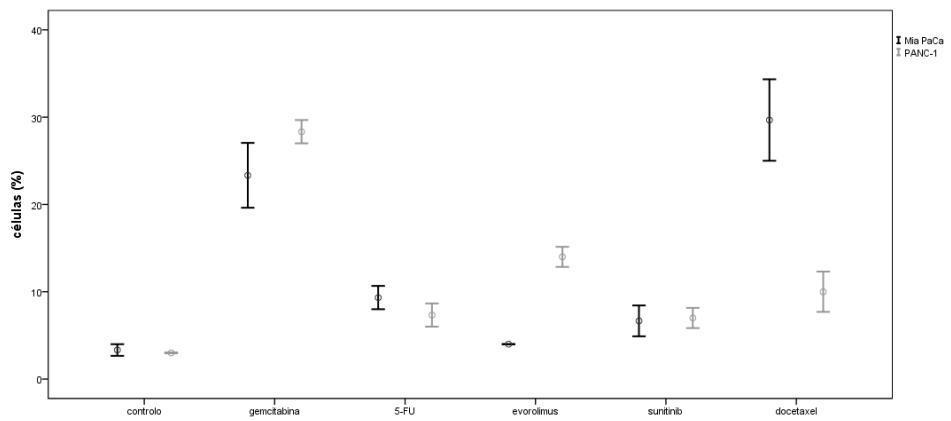
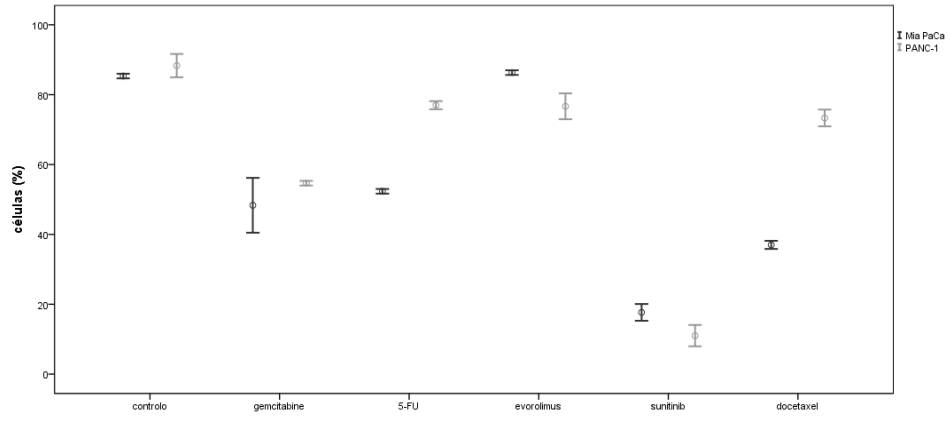
Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 15,592; p = 0,008$) entre os diferentes fármacos no que se refere à percentagem de células viáveis. Ao realizarmos testes *post-hoc* de comparações múltiplas corrigidas, só as células tratadas com sunitinib apresentam diferenças ($p = 0,009$) em relação ao controlo. Todavia, sem as comparações múltiplas corrigidas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ($p = 0,006$), entre o controlo e as células tratadas com sunitinib ($p = 0,001$), e entre as células tratadas com sunitinib e as tratadas com 5-FU ($p = 0,019$).

No que respeita à percentagem de células não viáveis, em apoptose ou em necrose, existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 16,429; p = 0,006$) entre os fármacos. Realizando testes *post-hoc* com correção para comparações múltiplas, a única diferença estatisticamente significativa encontrada foi entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ($p = 0,030$).

Sem as comparações múltiplas corrigidas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ($p = 0,002$), entre o controlo e as células tratadas com sunitinib ($p = 0,005$), e entre o controlo e as células tratadas com docetaxel ($p = 0,007$), entre as células tratadas com everolimus e as tratadas com gemcitabina ($p = 0,012$), entre as células tratadas com everolimus e as tratadas com sunitinib ($p = 0,027$), e entre as células tratadas com everolimus e as tratadas com docetaxel ($p = 0,034$).

Análise da viabilidade e da morte celulares (MIA PaCa-2 vs. PANC-1)

A Fig. 14 incorpora quatro gráficos que descrevem a percentagem de células em cada estágio nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 em função dos fármacos utilizados.



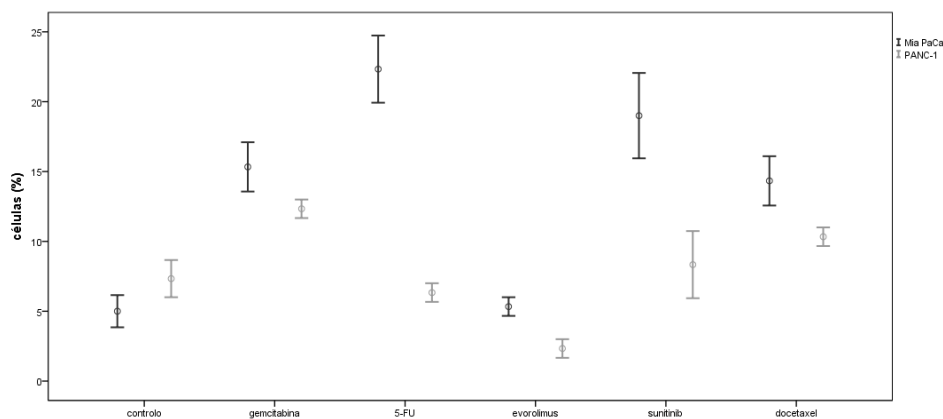


Figura 14 - Comparação da percentagem de células em cada estágio (V – células viáveis; A – células em apoptose; A/N – células em apoptose/células em necrose; N – células em necrose) entre as linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, em função do controlo e dos fármacos gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel.

A Tabela 24 descreve os resultados estatísticos da comparação entre as duas linhas celulares para cada fármaco e para cada tipo de morte celular.

Tabela 24 - Comparação estatística entre o estágio de morte celular e os fármacos utilizados nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1

	V	A	A/N	N
Gemcitabina	$p = 0,507$	$p = 0,072$	$p = 0,105$	$p = 0,046$
5-FU	$p = 0,046$	$p = 0,099$	$p = 0,037$	$p = 0,046$
Everolimus	$p = 0,046$	$p = 0,037$	$p = 0,099$	$p = 0,043$
Sunitinib	$p = 0,050$	$p = 0,822$	$p = 0,077$	$p = 0,050$
Docetaxel	$p = 0,050$	$p = 0,046$	$p = 0,034$	$p = 0,046$

5.5.3. Avaliação do ciclo celular

O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo através da coloração com PI/RNase, uma vez que este se intercala na macromolécula de dupla cadeia do ADN. A quantificação do corante permite-nos conhecer, indiretamente, o conteúdo em ADN e, assim, perceber a distribuição de uma população celular ao longo das diferentes fases do ciclo celular.

O gráfico 21 representa a percentagem de células em diferentes fases do ciclo celular, na linha MIA PaCa-2, após aplicação dos fármacos em estudo.

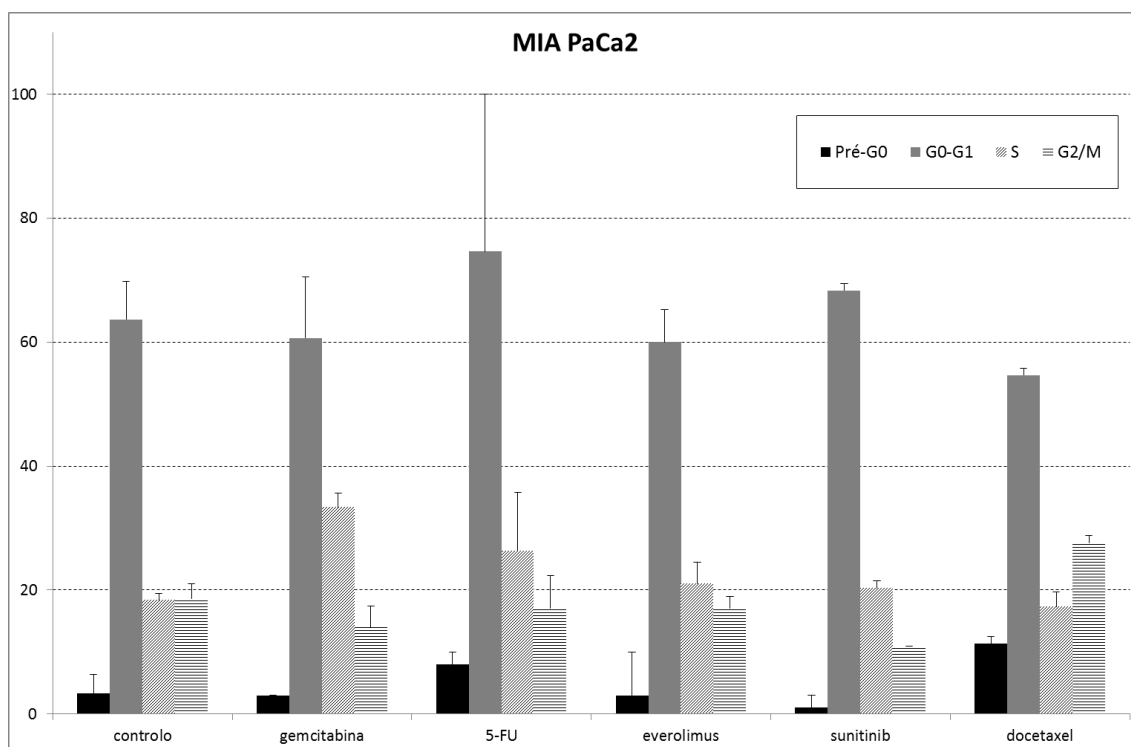


Gráfico 21 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo, usando a coloração com PI/RNase na linha celular MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em pré-G0, em G0/G1, em S e em G2/M, após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. Os resultados exprimem a média de 3 experiências independentes \pm 2 desvio padrão.

O Gráfico 22 representa a percentagem de células em diferentes fases do ciclo celular, nas linha PANC-1, após aplicação dos fármacos em estudo.

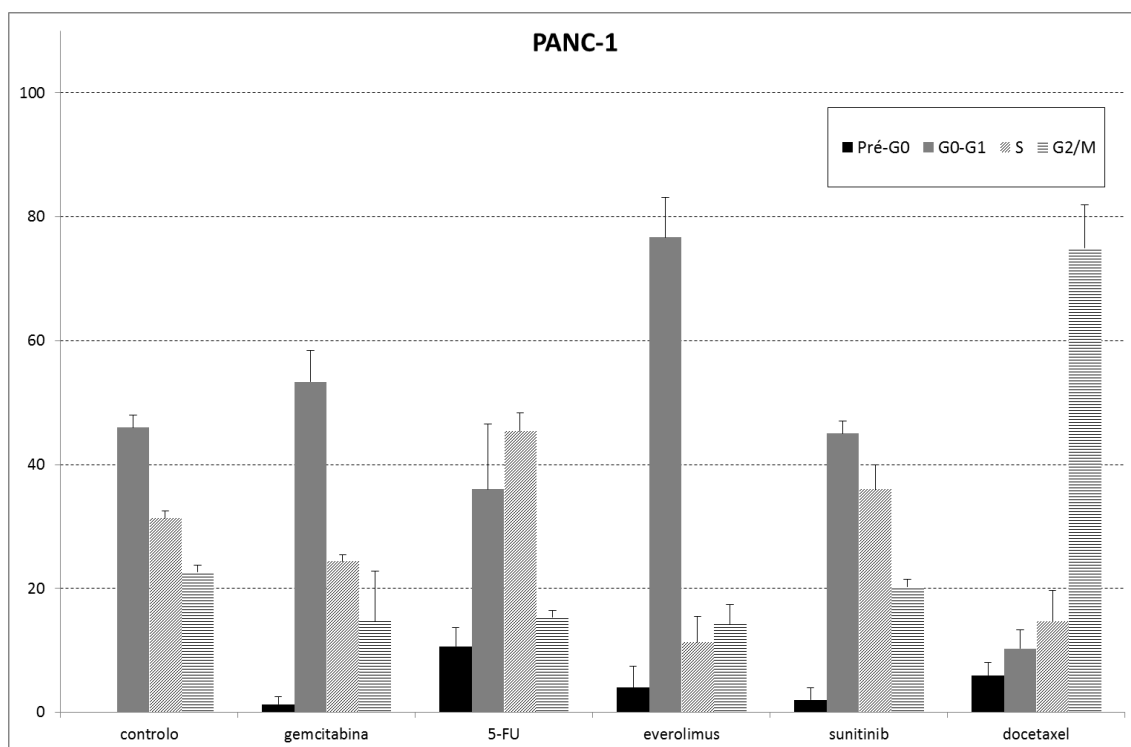


Gráfico 22 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo, usando a coloração com PI/RNase na linha celular PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em pré-G0, em G0/G1, em S e em G2/M, após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. Os resultados exprimem a média de 3 experiências independentes \pm 2 desvio padrão.

Análise estatística

O ciclo celular foi analisado considerando as diferenças observadas em cada uma das fases do ciclo celular (pré-G0, G0/G1, S e G2/M) devidas à ação dos fármacos em investigação.

Estas diferenças foram avaliadas, para cada linha celular, recorrendo a testes não paramétricos, nomeadamente o teste Kruskal-Wallis, e testes independentes *post-hoc* corrigidos para múltiplas comparações (Dunn-Sidak). As diferenças entre as duas linhas celulares foram também avaliadas usando os testes Mann-Whitney.

A análise estatística foi realizada usando a plataforma estatística IBM-SPSS v.20 e assumindo 0,05 como nível de significância.

Análise do ciclo celular da linha celular MIA PaCa-2

O Gráfico 23 representa a percentagem de células MIA PaCa-2 na fase pré-G0 do ciclo celular, para cada fármaco.

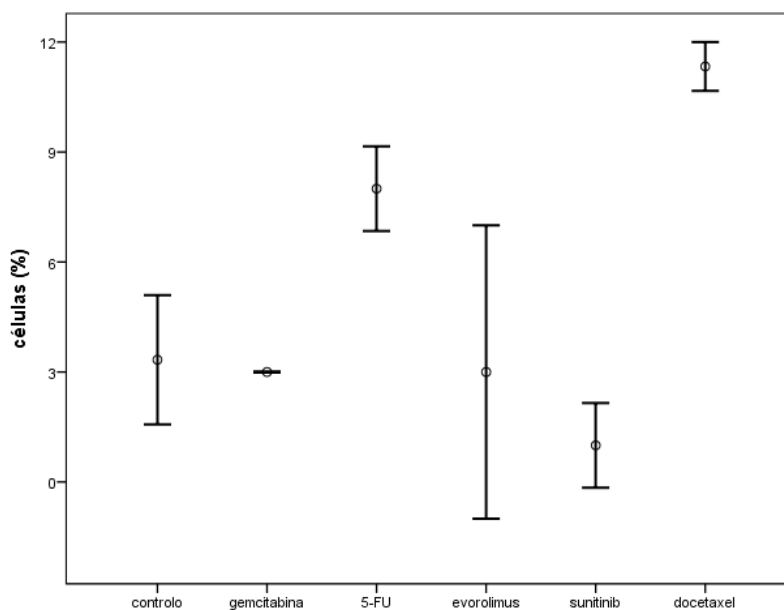


Gráfico 23 - Análise estatística do ciclo celular na linha MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em pré-G0 após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 13,780$; $p = 0,017$) entre os fármacos no que respeita à fase pré-G0. Todavia, nenhum dos fármacos é diferente do controlo e a única diferença detetável ($p = 0,020$) ocorre entre as células tratadas com docetaxel e as tratadas com sunitinib.

O Gráfico 24 representa a percentagem de células MIA PaCa-2 na fase G0/G1 do ciclo celular, para cada fármaco.

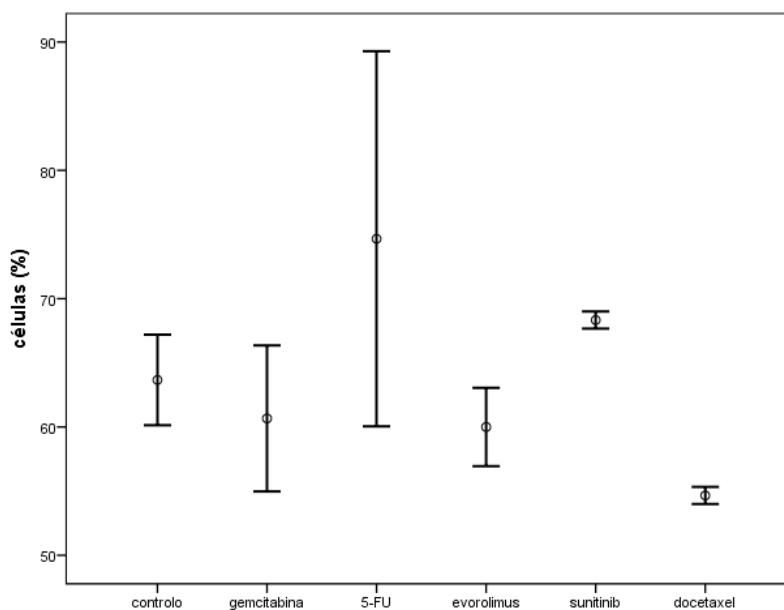


Gráfico 24 - Análise estatística do ciclo celular na linha MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em G0/G1 após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 13,937; p = 0,016$) entre os fármacos no que respeita à fase G0/G1. Todavia, nenhum dos fármacos é diferente do controlo e a única diferença detetável ($p = 0,032$) ocorre entre as células tratadas com 5-FU e as tratadas com docetaxel.

O Gráfico 25 representa a percentagem de células MIA PaCa-2 na fase S do ciclo celular, para cada fármaco.

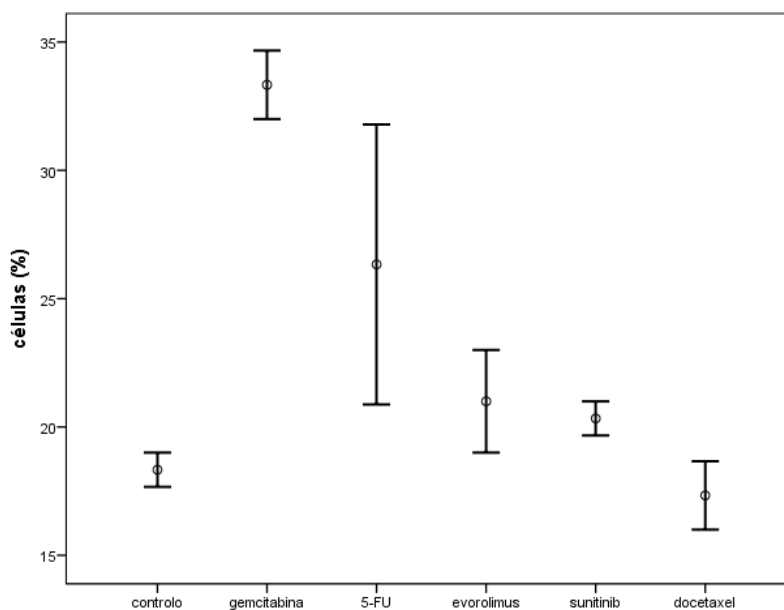


Gráfico 25 - Análise estatística do ciclo celular na linha MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em fase S após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 15,326; p = 0,009$) entre os fármacos no que respeita à fase S. Todavia, nenhum dos fármacos é diferente do controlo e a única diferença detetável ($p = 0,014$) ocorre entre as células tratadas com gemcitabina e as tratadas com docetaxel.

O Gráfico 26 representa a percentagem de células MIA PaCa-2 na fase G2/M do ciclo celular, para cada fármaco.

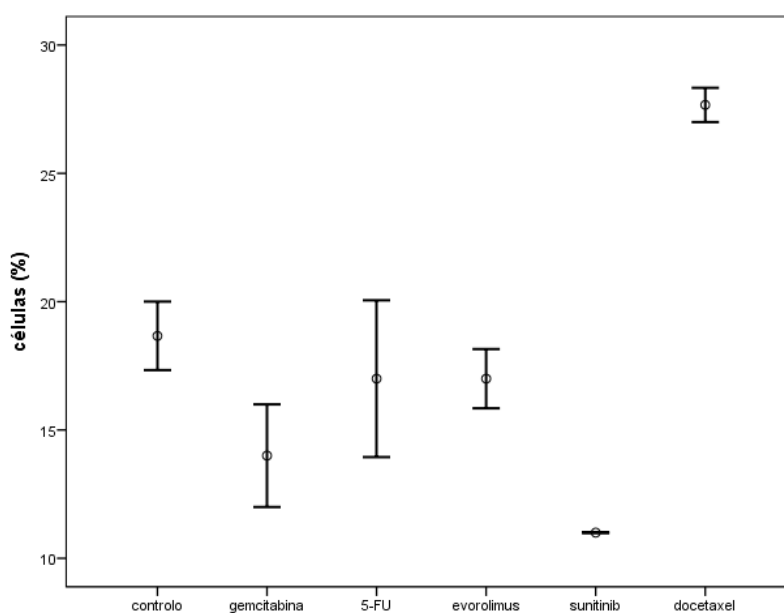


Gráfico 26 - estatística do ciclo celular na linha MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em fase G2/M após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 14,952; p = 0,011$) entre os fármacos no que respeita à fase G2/M. Todavia, nenhum dos fármacos é diferente do controlo e a única diferença detetável ($p = 0,008$) ocorre entre as células tratadas com docetaxel e as tratadas com sunitinib.

Análise do ciclo celular da linha celular PANC-1

O Gráfico 27 representa a percentagem de células PANC-1 na fase pré-G0 do ciclo celular, para cada fármaco.

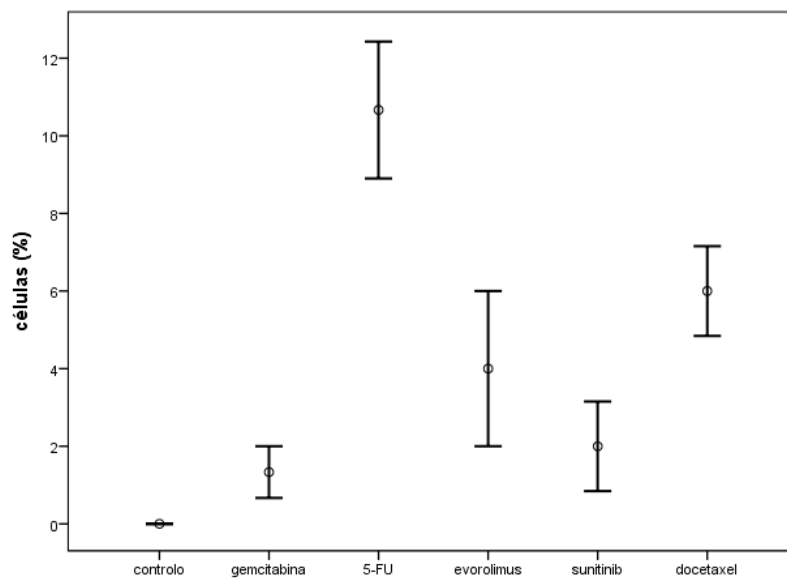


Gráfico 27 - Análise estatística do ciclo celular na linha PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em pré-G0 após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 15,884; p = 0,007$) entre os fármacos no que respeita à fase pré-G0. Apenas o 5-FU apresenta diferenças significativas com o controlo ($p = 0,008$).

O Gráfico 28 representa a percentagem de células PANC-1 na fase G0/G1 do ciclo celular, para cada fármaco.

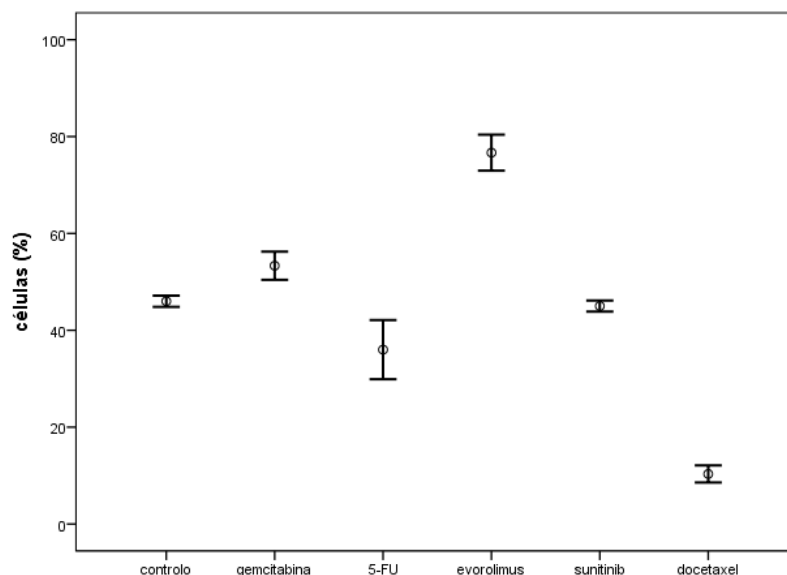


Gráfico 28 - Análise estatística do ciclo celular na linha PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em G0/G1 após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 16,285; p = 0,006$) entre os fármacos no que respeita à fase G0/G1. Todavia, nenhum dos fármacos é diferente do controlo e a única diferença detetável ($p = 0,009$) ocorre entre as células tratadas com everolimus e as tratadas com docetaxel.

O Gráfico 29 representa a percentagem de células PANC-1 na fase S do ciclo celular, para cada fármaco.

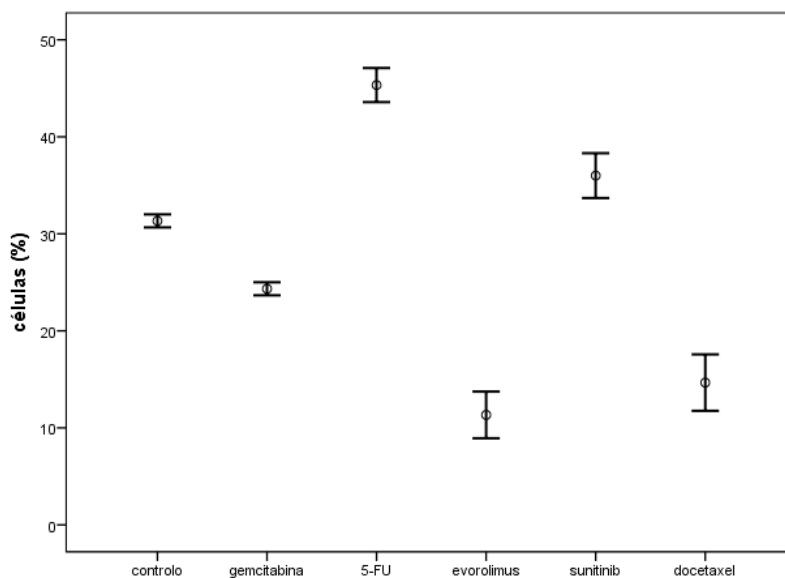


Gráfico 29 - Análise estatística do ciclo celular na linha PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em fase S após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 16,366; p = 0,006$) entre os fármacos no que respeita à fase S. Todavia, nenhum dos fármacos é diferente do controlo e a única diferença detetável ($p = 0,013$) ocorre entre as células tratadas com 5-FU e as tratadas com everolimus.

O Gráfico 30 representa a percentagem de células PANC-1 na fase G2/M do ciclo celular, para cada fármaco.

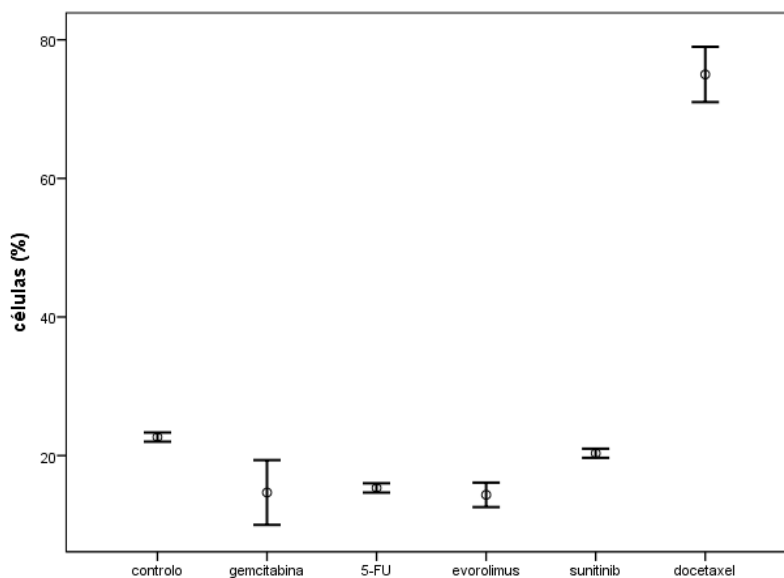


Gráfico 30 - Análise estatística do ciclo celular na linha PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em fase G2/M após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.

Existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 15,029$; $p = 0,010$) entre os fármacos no que respeita à fase G2/M. Todavia, nenhum dos fármacos é diferente do controlo e a única diferença detetável ($p = 0,037$) ocorre entre as células tratadas com docetaxel e as tratadas com everolimus.

Análise do ciclo celular (MIA PaCa-2 vs. PANC-1)

A Fig. 15 incorpora quatro gráficos que descrevem a percentagem de células em cada fase do ciclo celular, para as linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 em função dos fármacos utilizados.

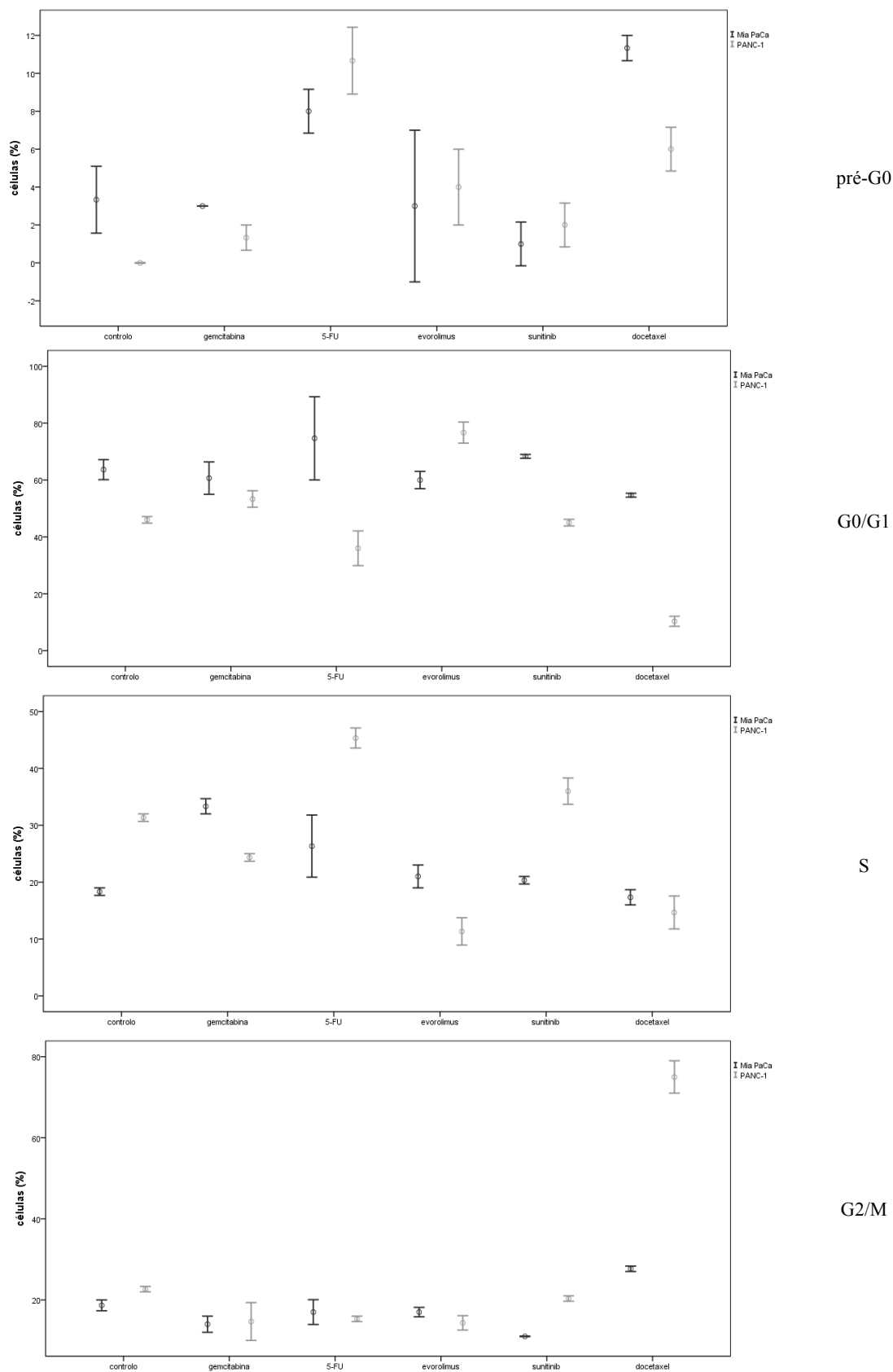


Figura 15 - Comparação da percentagem de células em cada fase do ciclo celular (pré-G0, G0/G1, S e G2/M) entre as linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, em função do controlo e dos fármacos gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel.

A Tabela 25 descreve os resultados estatísticos da comparação entre as duas linhas celulares para cada fármaco e para cada fase do ciclo celular.

Tabela 25 - Comparação estatística entre a fase do ciclo celular e o fármaco utilizado nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1

	Pré-G0	G0/G1	S	G2/M
Gemcitabina	$p = 0,034$	$p = 0,127$	$p = 0,043$	$p = 0,500$
5-FU	$p = 0,077$	$p = 0,050$	$p = 0,050$	$p = 0,507$
Everolimus	$p = 0,500$	$p = 0,050$	$p = 0,046$	$p = 0,077$
Sunitinib	$p = 0,261$	$p = 0,046$	$p = 0,046$	$p = 0,034$
Docetaxel	$p = 0,046$	$p = 0,046$	$p = 0,121$	$p = 0,043$

5.6. Perfil morfológico das células após quimioterapia

A Tabela 26 apresenta os resultados da imunofenotipagem das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1, com os marcadores previamente selecionados, após modulação celular com os citostáticos sunitinib, gemcitabina, 5-FU, everolimus e docetaxel.

Tabela 26 - Imunofenotipagem das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 após 72h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 dos diferentes fármacos

		MIA PaCa-2	PANC-1	MIA PaCa-2	PANC-1	MIA PaCa-2	PANC-1	MIA PaCa-2	PANC-1	MIA PaCa-2	PANC-1
Marcador	Morfologia	S < células grandes	S	G < células grandes	G	5-FU < células grandes	5-FU	E	E	D < células grandes	D
CK5.6	Células grandes (isoladas)	++	-	+	++	Perdidas	+++ Baixa int.	+++	+++	+	++++
	Células intermédias (estreladas)	F, +	+	F, +	++	F, +	+++	F, +++	+++	F, +	+++
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	Perdidas	Perdidas	+++	+++	-	-	Perdidas	Perdidas
AE1/AE3	Células grandes (isoladas)	++	++	-	++	+++	+++	+++	++	+	+++
	Células intermédias (estreladas)	F, ++	+	F, +	++	F, +	++	F, +++	++	F, +	+++
	Células pequenas (mórula)	++	+++	Perdidas	Perdidas	+++	++	+++	++	Perdidas	Perdidas
E-Caderina	Células grandes (isoladas)	-	-	-	N, ++	-	-	-	-	-	-
	Células intermédias (estreladas)	F, -	-	F, -	-	F, -	-	F, -	-	F, -	-
	Células pequenas (mórula)	-	+++	Perdidas	Perdidas	-	-	-	-	Perdidas	Perdidas
Vimentina	Células grandes (isoladas)	+++	+++ Baixa int.	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Células intermédias (estreladas)	F, +++	+++ Baixa int.	F, +++	+	F, +	+++	F, +++	+++	F, +++	+++
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	Perdidas	Perdidas	+++	+++	+++	+++	Perdidas	Perdidas
Cromogrina A	Células grandes (isoladas)	-	-	++	+++ Baixa int.	++	+++	++	-	+	+++
	Células intermédias (estreladas)	F, -	-	F, +	+++ Baixa int.	F, +	+++	F, ++	-	F, -	+++
	Células pequenas (mórula)	-	+++	Perdidas	Perdidas	+++	+++	-	-	Perdidas	Perdidas
CD 56	Células grandes (isoladas)	+++	-	++	-	-	-	-	-	+	+
	Células intermédias (estreladas)	F, +	-	F, ++	-	F, -	-	F, -	-	F, +	+
	Células pequenas (mórula)	+++	+++ Baixa int.	Perdidas	Perdidas	-	+++	-	-	Perdidas	Perdidas
Sinaptofisina	Células grandes (isoladas)	++	+++ Baixa int.	++	-	+	-	+	+	+	-
	Células intermédias (estreladas)	F, +	+++ Baixa int.	F, -	++	F, +	-	F, +	-	F, +	+
	Células pequenas (mórula)	++	+++	Perdidas	Perdidas	++	++	++	+++	Perdidas	Perdidas

		MIA PaCa-2	PANC-1	MIA PaCa-2	PANC-1	MIA PaCa-2	PANC-1	MIA PaCa-2	PANC-1	MIA PaCa-2	PANC-1
Marcador	Morfologia	S < células grandes	S	G < células grandes	G	5-FU < células grandes	5-FU	E	E	D < células grandes	D
SSTR2	Células grandes (isoladas)	+++	-	+++	+++	+	+	+++	-	+	+++
	Células intermédias (estreladas)	F, +++	N, +	F, +++	++	F, +	+	F, +++	-	F, +	+
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	Perdidas	Perdidas	+++	++	+++	-	Perdidas	Perdidas
NTR1	Células grandes (isoladas)	-	-	-	-	N, +	-	+	+ Baixa int.	-	-
	Células intermédias (estreladas)	F, -	-	F, -	-	F, -	-	F, +	+ Baixa int.	F, -	-
	Células pequenas (mórula)	-	++	Perdidas	Perdidas	-	+	-	-	Perdidas	Perdidas

Cut off: - (0%); + (<10%); ++ (10-75%); +++ (>75%); S – sunitinib; G – gemcitabina; 5-FU – 5-fluorouracilo; E – everolimus; D – docetaxel; F – células fusiformes; N – núcleos; Baixa int. = Baixa intensidade; Perdidas – células não observáveis.

A Tabela 27 apresenta os resultados da imunofenotipagem da linha celular MIA PaCa-2 com os marcadores previamente selecionados, sem e após modulação celular com os fármacos sunitinib, gemcitabina, 5-FU, everolimus e docetaxel.

Tabela 27 - Imunofenotipagem da linha celular MIA PaCa-2 sem e após 72h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 dos diferentes fármacos

		MIA PaCa-2	MIA PaCa-2	MIA PaCa-2	MIA PaCa-2	MIA PaCa-2	MIA PaCa-2
Marcador	Morfologia	Controlo	S < células grandes	G < células grandes	5-FU < células grandes	E	D < células grandes
CK5.6	Células grandes (isoladas)	+++	++	+	Perdidas	+++	+
	Células intermédias (estreladas)	X	F, +	F, +	F, +	F, +++	F, +
	Células pequenas (mórula)	++	+++	Perdidas	+++	-	Perdidas
AE1/AE3	Células grandes (isoladas)	+++	++	-	+++	+++	+
	Células intermédias (estreladas)	X	F, ++	F, +	F, +	F, +++	F, +
	Células pequenas (mórula)	+++	++	Perdidas	+++	+++	Perdidas
E-Caderina	Células grandes (isoladas)	+++	-	-	-	-	-
	Células intermédias (estreladas)	X	F, -	F, -	F, -	F, -	F, -
	Células pequenas (mórula)	+++	-	Perdidas	-	-	Perdidas

		MIA PaCa-2	MIA PaCa-2	MIA PaCa-2	MIA PaCa-2	MIA PaCa-2	MIA PaCa-2
	Morfologia	Controlo	S < células grandes	G < células grandes	5-FU < células grandes	E	D < células grandes
Vimentina	Células grandes (isoladas)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Células intermédias (estreladas)	X	F, +++	F, +++	F, +	F, +++	F, +++
	Células pequenas (mórula)	++	+++	Perdidas	+++	+++	Perdidas
Cromogranina A	Células grandes (isoladas)	-/+	-	++	++	++	+
	Células intermédias (estreladas)	X	F, -	F, +	F, +	F, ++	F, -
	Células pequenas (mórula)	+++	-	Perdidas	+++	-	Perdidas
CD 56	Células grandes (isoladas)	-/+	+++	++	-	-	+
	Células intermédias (estreladas)	X	F, +	F, ++	F, -	F, -	F, +
	Células pequenas (mórula)	-	+++	Perdidas	-	-	Perdidas
Sinaptofisina	Células grandes (isoladas)	+	++	++	+	+	+
	Células intermédias (estreladas)	X	F, +	F, -	F, +	F, +	F, +
	Células pequenas (mórula)	-	++	Perdidas	++	++	Perdidas
Somatostatina 2 (SSTR2)	Células grandes (isoladas)	+++	+++	+++	+	+++	+
	Células intermédias (estreladas)	X	F, +++	F, +++	F, +	F, +++	F, +
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	Perdidas	+++	+++	Perdidas
Neurotensina 1 (NTR1)	Células grandes (isoladas)	++	-	-	N, +	+	-
	Células intermédias (estreladas)	X	F, -	F, -	F, -	F, +	F, -
	Células pequenas (mórula)	++	-	Perdidas	-	-	Perdidas

Cut off: - (0%); + (<10%); ++ (10-75%); +++ (>75%); S – sunitinib; G – gemcitabina ; 5-FU – 5-fluorouracilo; E – everolimus; D – docetaxel; F – células fusiformes; N – núcleos; Perdidas – células não observáveis.

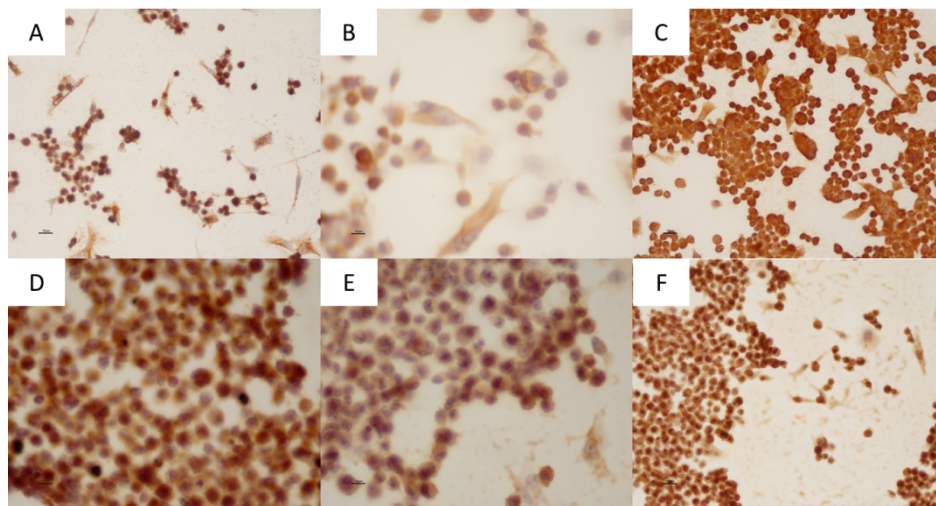


Figura 16 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com sunitinib. **A:** CK5.6 x200; **B:** AE1/AE3 x400; **C:** Vimentina x200; **D:** CD56 x400; **E:** Sinaptofisina x400; **F:** SSTR2 x200. Barra de escala: 10 μ m.

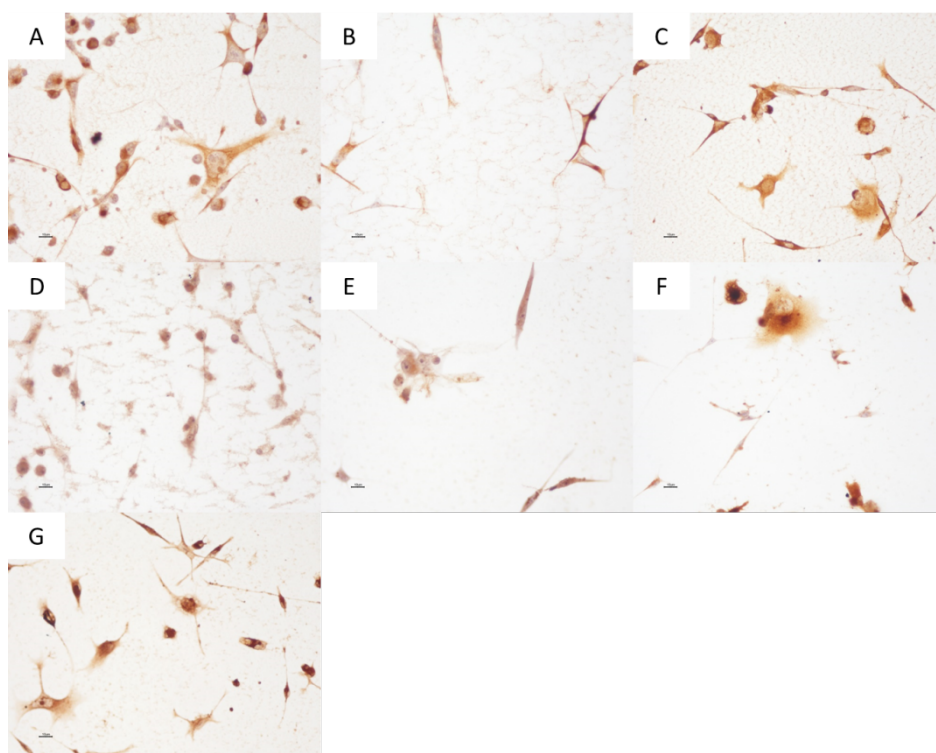


Figura 17 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com gemcitabina. **A:** CK5.6 x200; **B:** AE1/AE3 x200; **C:** Vimentina x200; **D:** Cromogranina A x200; **E:** CD56 x200; **F:** Sinaptofisina x200; **G:** SSTR2 x200. Barra de escala: 10 μ m.

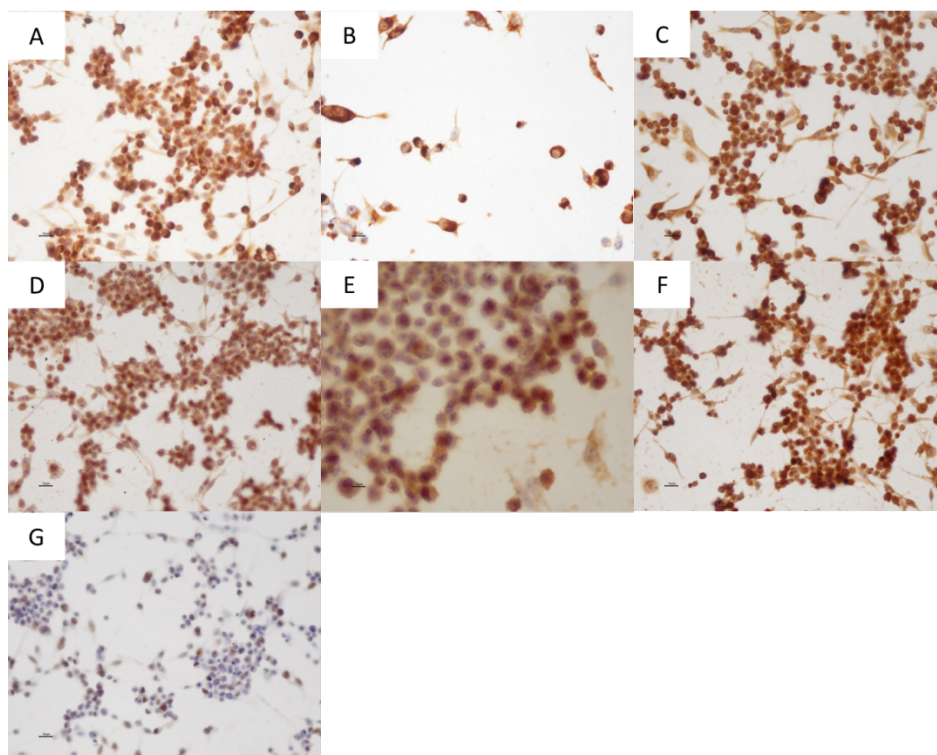


Figura 18 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com 5-FU. **A:** CK5.6 x200; **B:** AE1/AE3 x200; **C:** Vimentina x200; **D:** Cromogranina A x200; **E:** Sinaptofisina x400; **F:** SSTR2 x200; **G:** NTR1 x200. Barra de escala: 10 μm.

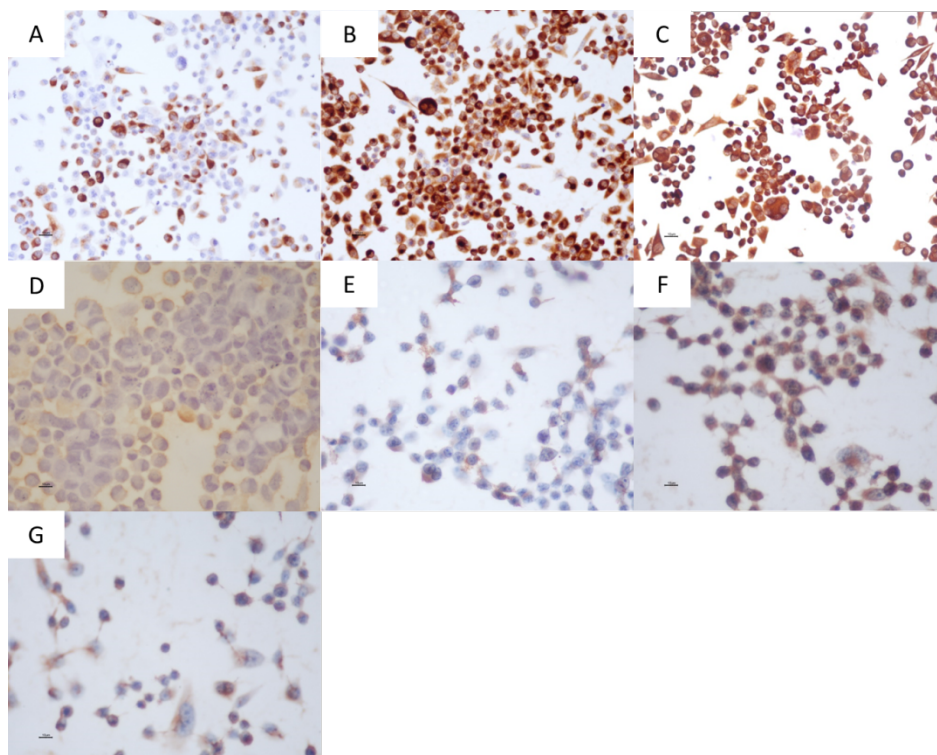


Figura 19 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica celular após 72horas de quimioterapia com everolimus. **A:** CK5.6 x200; **B:** AE1/AE3 x200; **C:** Vimentina x200; **D:** Cromogranina A x400; **E:** Sinaptofisina x400; **F:** SSTR2 x400; **G:** NTR1 x400. Barra de escala: 10 μm.

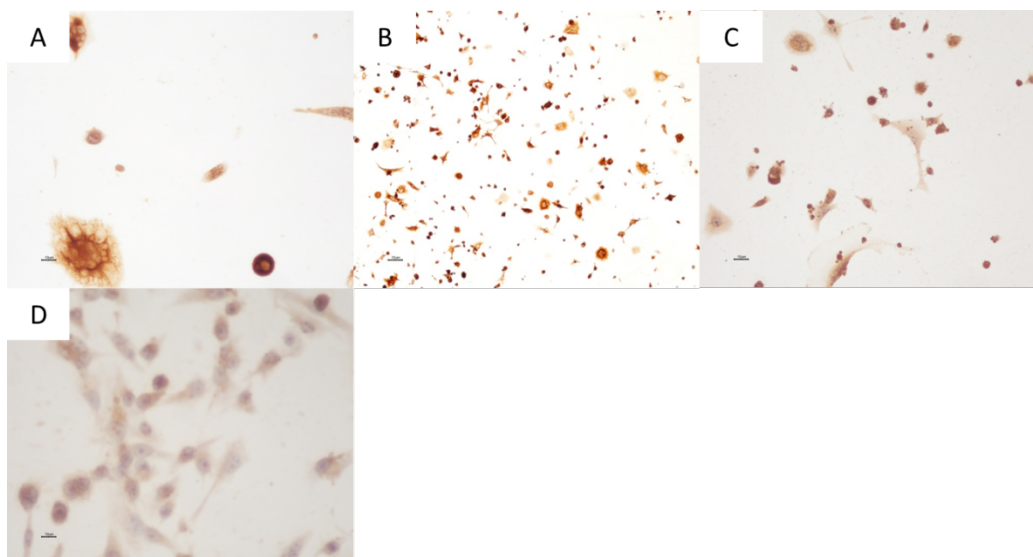


Figura 20 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com docetaxel. **A:** CK5.6 x200; **B:** AE1/AE3 x200; **C:** Cromogranina A x200; **D:** CD56 x400. Barra de escala: 10 µm.

Os gráficos 31 e 32 apresentam os dados respeitantes aos marcadores imunohistoquímicos avaliados na linha MIA PaCa-2. Cada ponto na linha radial representa um marcador imunohistoquímico e a linha distribui-se por uma escala que vai desde - a +++. As células grandes e as células pequenas foram testadas para nove marcadores.

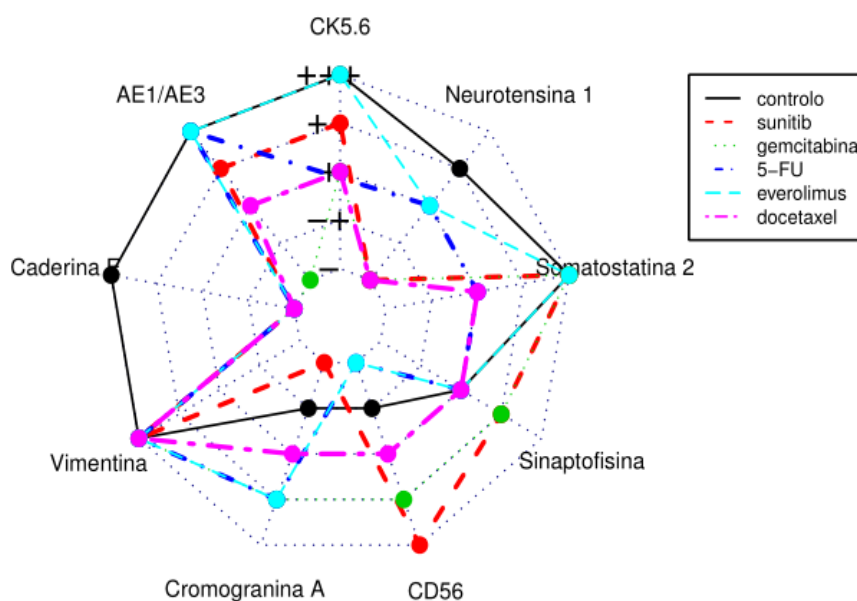


Gráfico 31 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica das células grandes, após modulação celular com citostáticos. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).

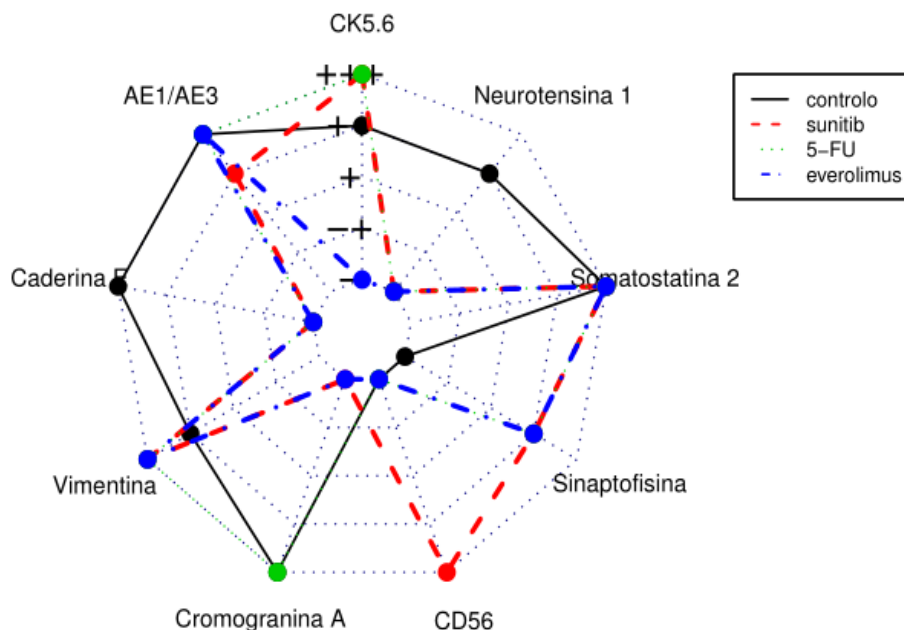


Gráfico 32 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica das células pequenas, após modulação celular com citostáticos. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).

A Tabela 28 apresenta os resultados da imunofenotipagem da linha celular PANC-1 com os marcadores previamente selecionados, sem e após modulação celular com os fármacos sunitinib, gemcitabina, 5-FU, everolimus e docetaxel.

Tabela 28 - Imunofenotipagem da linha celular PANC-1 sem e após 72h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 dos diferentes fármacos

		PANC-1	PANC-1	PANC-1	PANC-1	PANC-1	PANC-1
Marcador	Morfologia	Controlo	S	G	5-FU	E	D
CK5.6	Células grandes (isoladas)	++	-	++	+++ Baixa int.	+++	++++
	Células intermédias (estreladas)	++	+	++	+++	+++	+++
	Células pequenas (mórula)	-	+++	Perdidas	+++	-	Perdidas
AE1/AE3	Células grandes (isoladas)	++	++	++	+++	++	+++
	Células intermédias (estreladas)	++	+	++	++	++	+++
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	Perdidas	++	++	Perdidas

		PANC-1	PANC-1	PANC-1	PANC-1	PANC-1	PANC-1
Marcador	Morfologia	Controlo	S	G	5-FU	E	D
E-Caderina	Células grandes (isoladas)	-	-	N, ++	-	-	-
	Células intermédias (estreladas)	-	-	-	-	-	-
	Células pequenas (mórula)	-	+++	Perdidas	-	-	Perdidas
Vimentina	Células grandes (isoladas)	++	+++ Baixa int.	++	+++	+++	+++
	Células intermédias (estreladas)	++	+++ Baixa int.	+	+++	+++	+++
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	Perdidas	+++	+++	Perdidas
Cromogranina A	Células grandes (isoladas)	+	-	+++ Baixa int.	+++	-	+++
	Células intermédias (estreladas)	+	-	+++ Baixa int.	+++	-	+++
	Células pequenas (mórula)	-	+++	Perdidas	+++	-	Perdidas
CD 56	Células grandes (isoladas)	+	-	-	-	-	+
	Células intermédias (estreladas)	+	-	-	-	-	+
	Células pequenas (mórula)	-	+++ Baixa int.	Perdidas	+++	-	Perdidas
Sinaptofisina	Células grandes (isoladas)	-	+++ Baixa int.	-	-	+	-
	Células intermédias (estreladas)	-	+++ Baixa int.	++	-	-	+
	Células pequenas (mórula)	-	+++	Perdidas	++	+++	Perdidas
SSTR2	Células grandes (isoladas)	+	-	+++	+	-	+++
	Células intermédias (estreladas)	+	N, +	++	+	-	+
	Células pequenas (mórula)	++	+++	Perdidas	++	-	Perdidas
NTR1	Células grandes (isoladas)	-	-	-	-	+ Baixa int.	-
	Células intermédias (estreladas)	-	-	-	-	+ Baixa int.	-
	Células pequenas (mórula)	-	++	Perdidas	+	-	Perdidas

Cut off: - (0%); + (<10%); ++ (10-75%); +++ (>75%); *citoplasma polarizado; S – sunitinib; G – gemcitabina; 5-FU – 5-fluorouracilo; E – everolimus; D – docetaxel; F – células fusiformes; N – núcleos; Baixa int. = Baixa intensidade; Perdidas – células não observáveis.

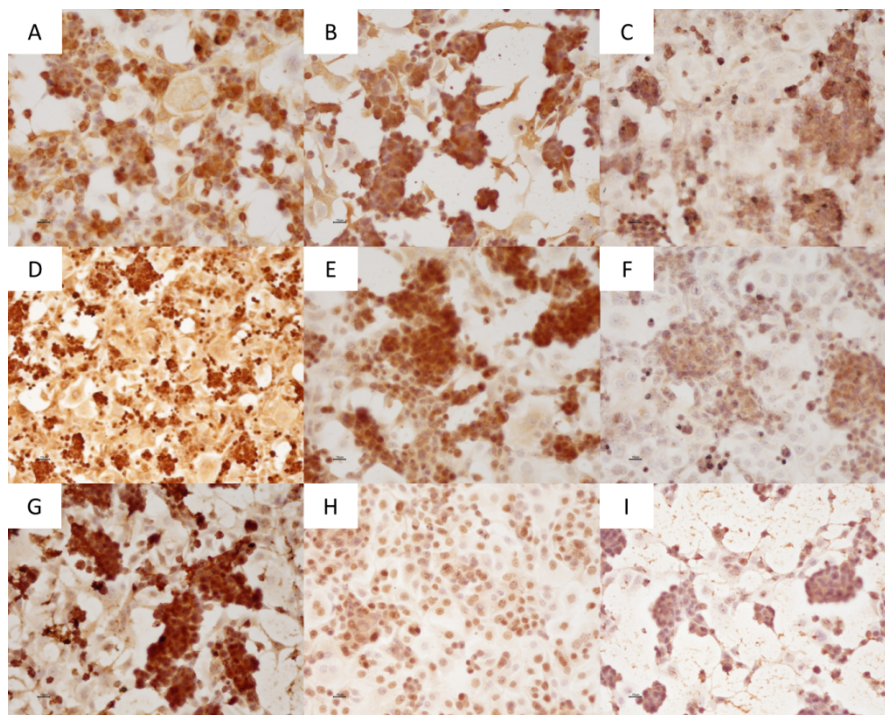


Figura 21 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com sunitinib. **A:** CK5.6 x200; **B:** AE1/AE3 x200; **C:** E-caderina x200; **D:** Vimentina x200; **E:** Cromogranina A x200; **F:** CD56 x200; **G:** Sinaptofisina x200; **H:** SSTR2 x200; **I:** NTR1 x200. Barra de escala: 10 μ m.

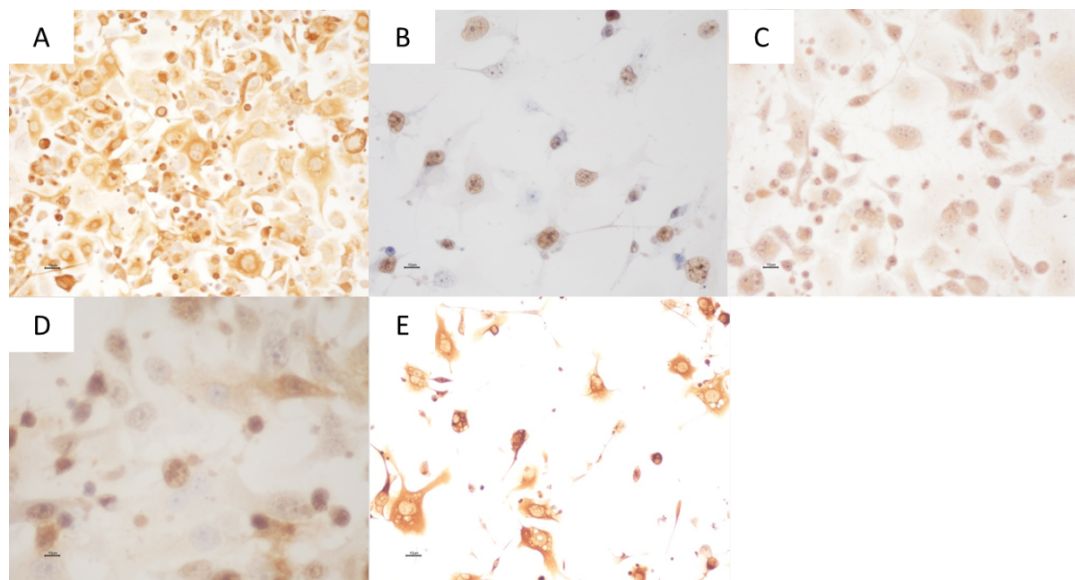


Figura 22 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com gemcitabina. **A:** CK5.6 x200; **B:** E-caderina x200; **C:** Vimentina x200; **D:** Sinaptofisina x400; **E:** SSTR2 x200. Barra de escala: 10 μ m.

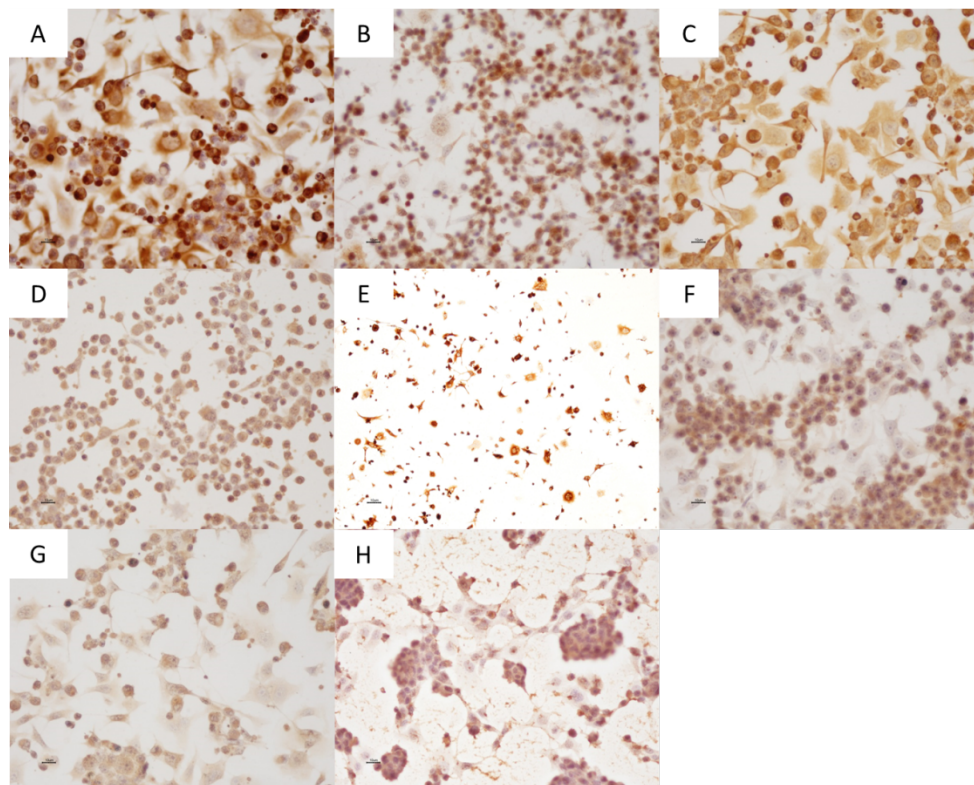


Figura 23 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com 5-FU. **A:** CK5.6 x200; **B:** AE1/AE3 x400; **C:** Vimentina x200; **D:** Cromogranina A x200; **E:** CD56 x200; **F:** Sinaptofisina x200; **G:** SSTR2 x200; **H:** NTR1 x200. Barra de escala: 10 μ m.

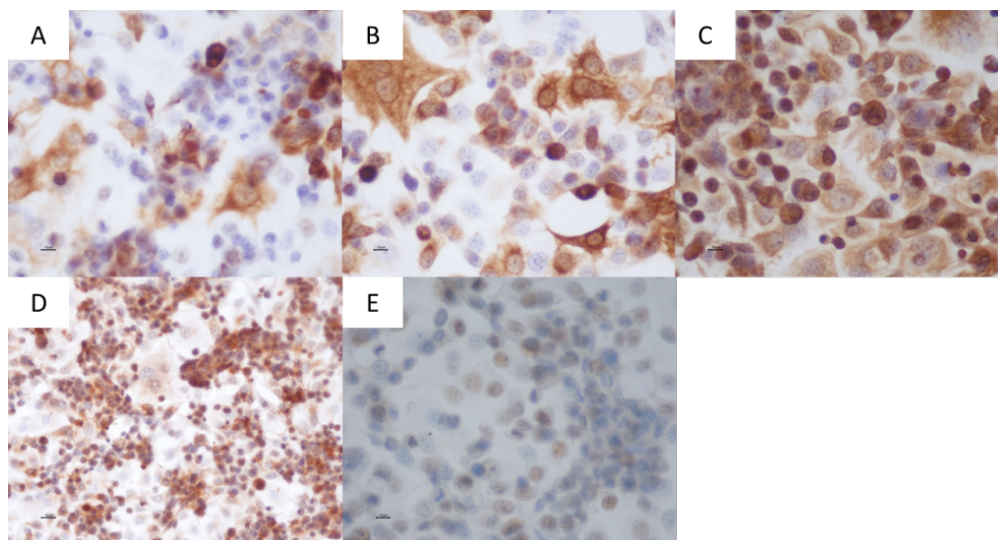


Figura 24 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com everolimus. **A:** CK5.6 x400; **B:** AE1/AE3 x400; **C:** Vimentina x400; **D:** Sinaptofisina x200; **E:** NTR1 x400. Barra de escala: 10 μ m.

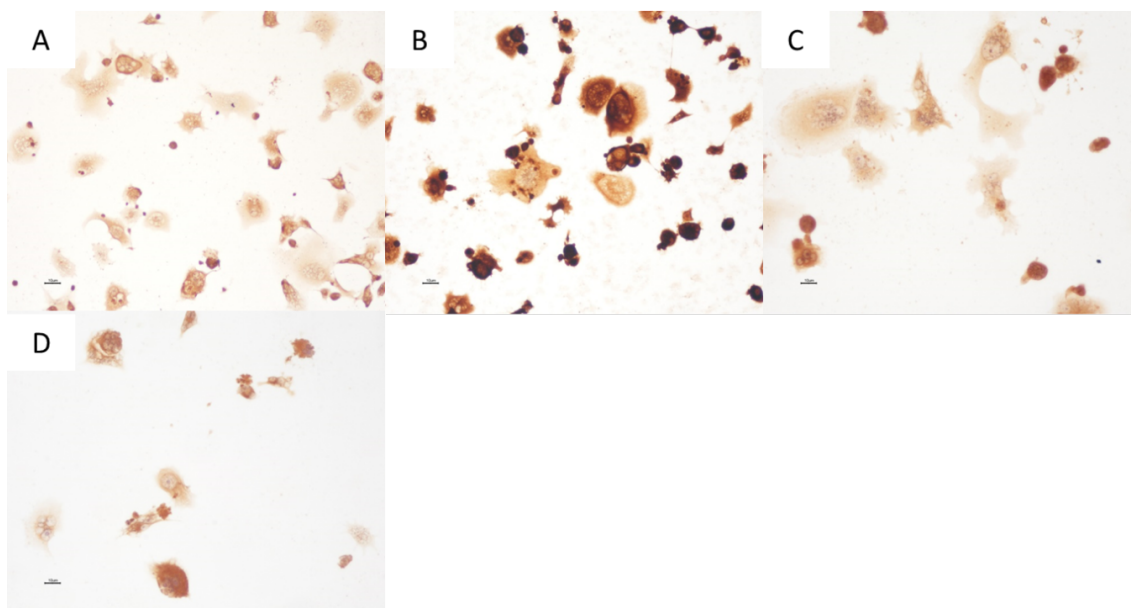


Figura 25 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72 horas de quimioterapia com docetaxel. **A:** CK5.6 x400; **B:** AE1/AE3 x400; **C:** Cromogranina A x400; **D:** SSTR2 x200. Barra de escala: 10 μ m.

Os gráficos 33 e 34 apresentam os dados respeitantes aos marcadores imunohistoquímicos avaliados na linha PANC-1. Cada ponto na linha radial representa um marcador imunohistoquímico e a linha distribui-se por uma escala que vai desde - a ++++. As células grandes e as células pequenas foram testadas para nove marcadores.

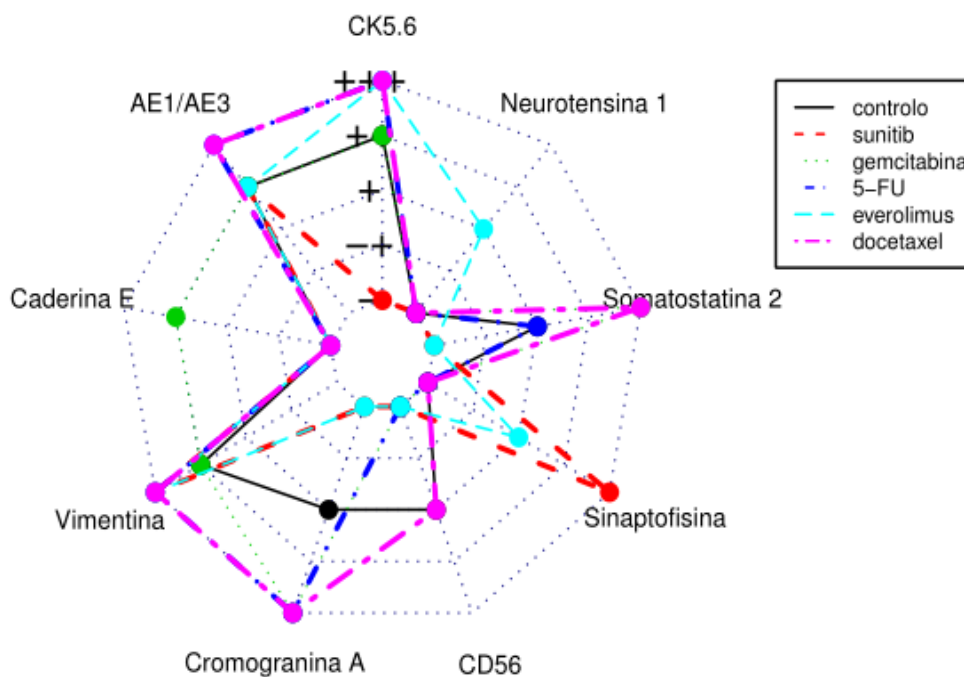


Gráfico 33 - PANC-1: Imunohistoquímica das células grandes, após modulação celular com citostáticos. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).

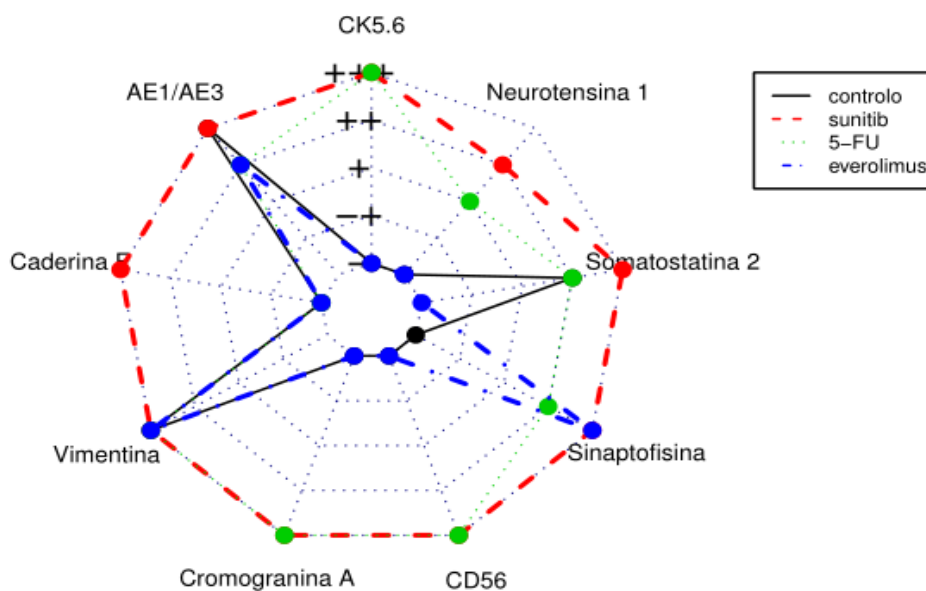


Gráfico 34 - PANC-1: Imunohistoquímica das células pequenas, após modulação celular com citostáticos. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).

5.7. Análise dos recetores da somatostatina após ação quimiossensibilizante dos citostáticos

Nesta parte do trabalho experimental pretendíamos saber se uma prévia incubação das células com os citostáticos selecionados alterava a expressão dos recetores de somatostatina.

A Fig. 26 traduz o estudo da expressão dos recetores de somatostatina na linha MIA PaCa-2.

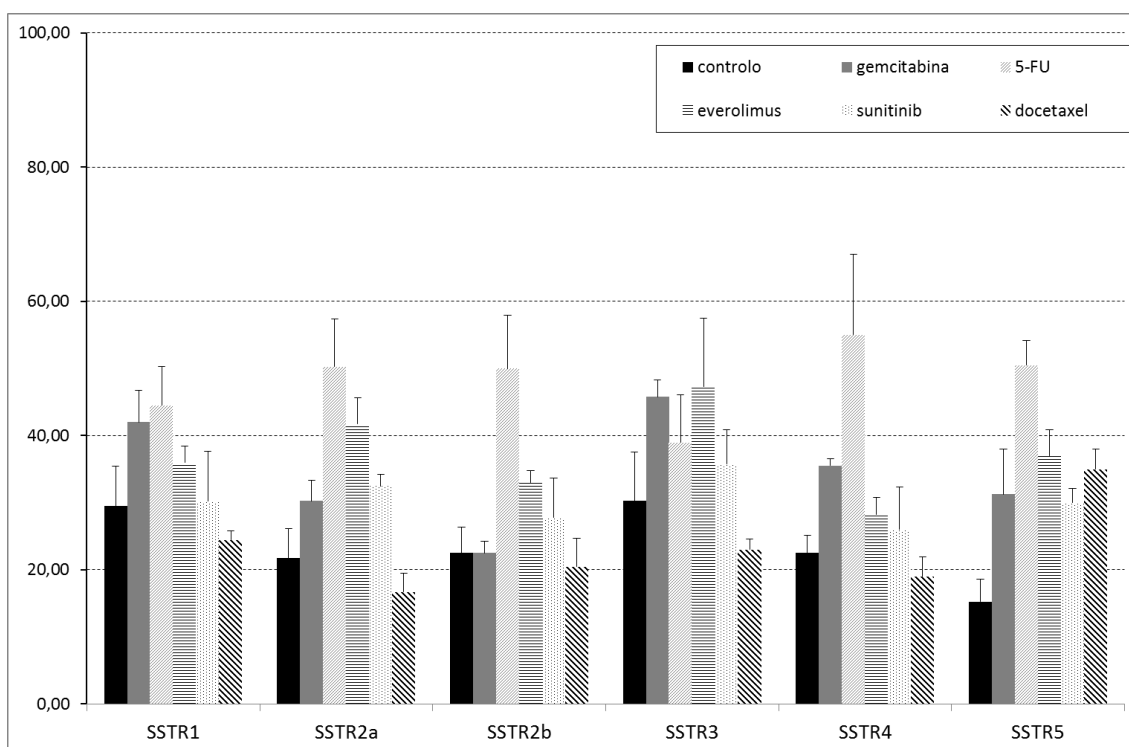


Figura 26 - Comparação da expressão dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5, na linha celular MIA PaCa-2, após incubação destas células durante 72 h com o IC50 das 72h, dos citostáticos gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel. As colunas representam as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o desvio padrão.

Análise estatística

Expressão dos recetores na linha MIA PaCa-2

A Tabela 29 representa a média (\bar{x}) e os valores de erro padrão dos diferentes tipos de recetores da somatostatina para os diferentes fármacos testados.

Tabela 29 - Comparação estatística da expressão dos recetores de somatostatina na linha MIA PaCa-2 após modulação celular com citostáticos

	SSTR1	SSTR2a	SSTR2b	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Controlo	29,50±2,96	21,75±2,18	22,50±1,94	30,25±3,64	22,50±1,32	15,25±1,65
Gemcitabina	42,00±2,38	30,25±1,55	22,205±0,85	45,75±1,25	35,50±0,50	31,25±3,35
5-FU	44,50±2,90	50,25±3,54	50,00±3,98	39,00±3,54	55,00±6,00	50,50±1,85
Everolimus	36,00±1,23	41,75±1,93	33,00±0,91	47,25±5,11	28,25±1,25	37,00±1,92
Sunitinib	30,25±3,68	32,50±0,87	27,75±2,96	35,75±2,56	26,00±3,19	30,00±1,08
Docetaxel	24,50±0,65	16,75±1,38	20,50±2,10	23,00±0,82	19,00±1,47	35,00±1,47

No que respeita ao SSTR1 (RS1) existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 18,175$; $p = 0,003$) entre os fármacos, Todavia, não existem diferenças com significado estatístico entre o grupo controlo.

No que respeita ao SSTR2a existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 21,097$; $p = 0,001$) entre os fármacos, Existe diferença, com significado estatístico, entre o controlo e as células tratadas com 5-FU ($p = 0,020$).

No que respeita ao SSTR2b existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 16,836$; $p = 0,005$) entre os fármacos, Todavia, não existem diferenças com significado estatístico para o grupo controlo.

No que respeita ao SSTR3 existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 16,690$; $p = 0,005$) entre os fármacos. Todavia, não existem diferenças com significado estatístico para o grupo controlo.

No que respeita ao SSTR4 existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 19,405$; $p = 0,002$) entre os fármacos. Todavia, não existem diferenças com significado estatístico para o grupo controlo.

No que respeita ao SSTR5 existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 18,492$; $p = 0,002$) entre os fármacos. Existe diferença, com significado estatístico, entre o controlo e as células tratadas com 5-FU ($p = 0,001$).

A Fig. 27 traduz o estudo da expressão dos recetores de somatostatina na linha PANC-1.

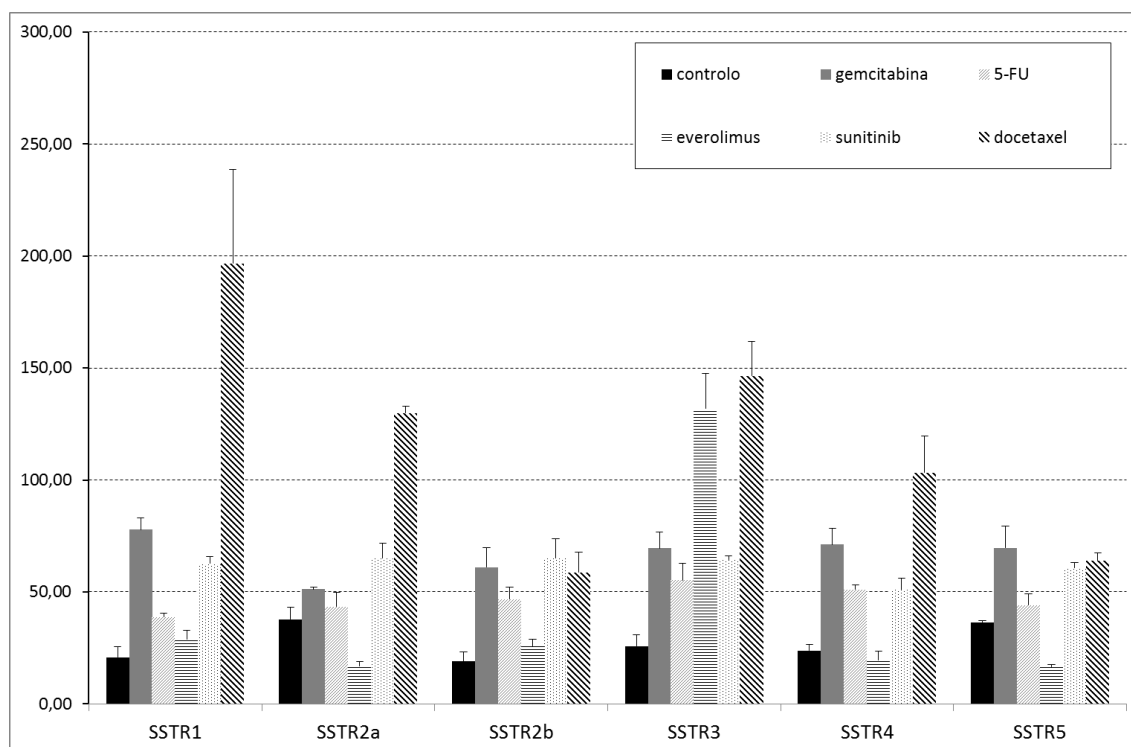


Figura 27 - Comparação da expressão dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5, na linha celular PANC-1, após incubação destas células durante 72 h com o IC50 das 72h, dos citostáticos gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel. As colunas representam as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o desvio padrão.

Análise estatística

Expressão dos recetores na linha PANC-1

A Tabela 30 representa a média (\bar{x}) e os valores de erro padrão dos diferentes tipos de recetores da somatostatina para os diferentes fármacos testados.

Tabela 30 - Comparação estatística da expressão dos recetores de somatostatina na linha PANC-1 após modulação celular com citostáticos

	SSTR1	SSTR2a	SSTR2b	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Controlo	20,75±2,46	37,75±2,78	19,00±2,04	25,75±2,53	23,75±1,44	36,50±0,29
Gemcitabina	77,75±2,69	51,25±0,48	61,00±4,38	69,50±3,57	71,25±3,57	69,75±4,77
5-FU	38,75±0,95	43,50±3,20	46,75±2,69	55,25±3,77	51,25±0,95	44,25±2,50
Everolimus	28,75±2,14	17,00±0,91	25,75±1,65	131,75±7,89	19,75±1,89	16,75±0,48
Sunitinib	62,75±1,49	65,00±3,34	65,25±4,19	64,50±0,87	51,25±2,39	60,75±1,11
Docetaxel	196,75±20,97	129,75±1,55	58,75±4,54	146,50±7,72	103,25±8,26	64,00±1,68

No que respeita ao SSTR1 existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 22,429; p < 0,001$) entre os fármacos. Existe diferença, com significado estatístico, entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ($p = 0,020$) e entre o controlo e as células tratadas com docetaxel ($p = 0,001$).

No que respeita ao SSTR2a existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 21,939; p = 0,001$) entre os fármacos. Existe diferença, com significado estatístico, entre o controlo e as células tratadas com docetaxel ($p = 0,040$).

No que respeita ao SSTR2b existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 19,101; p = 0,002$) entre os fármacos. Existe diferença, com significado estatístico, entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ($p = 0,044$) e entre o controlo e as células tratadas com sunitinib ($p = 0,010$).

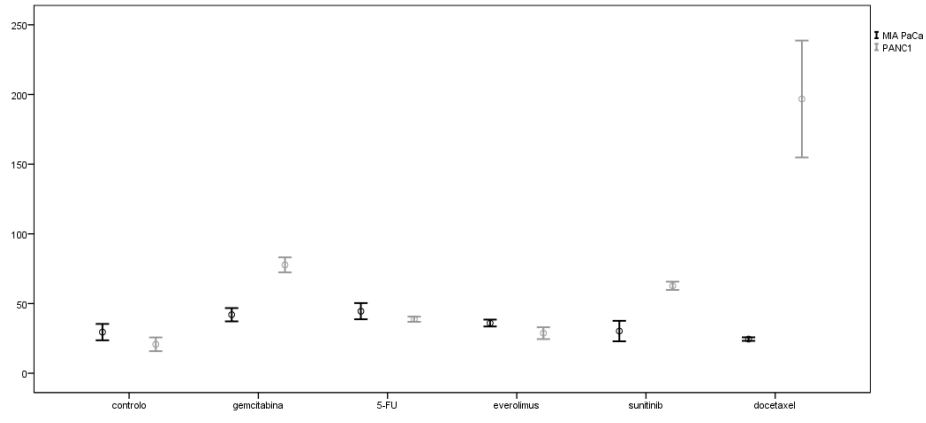
No que respeita ao SSTR3 existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 21,093; p = 0,001$) entre os fármacos. Existe diferença, com significado estatístico, entre o controlo e as células tratadas com docetaxel ($p = 0,002$) e entre o controlo e as células tratadas com everolimus ($p = 0,012$).

No que respeita ao SSTR4 existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 21,407; p = 0,001$) entre os fármacos. Existe diferença, com significado estatístico, entre o controlo e as células tratadas com docetaxel ($p = 0,002$).

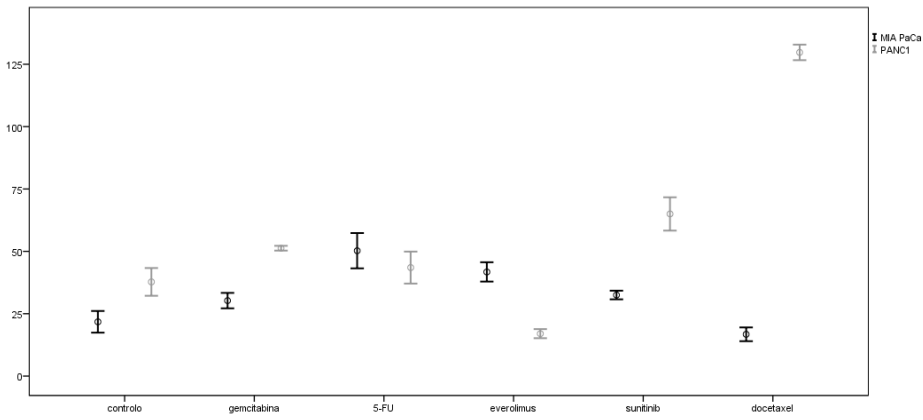
No que respeita ao SSTR5 existem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_{KW}(5) = 20,685; p = 0,001$) entre os fármacos. Todavia, não existem diferenças com significado estatístico para o grupo controlo.

Comparação dos recetores entre as linhas

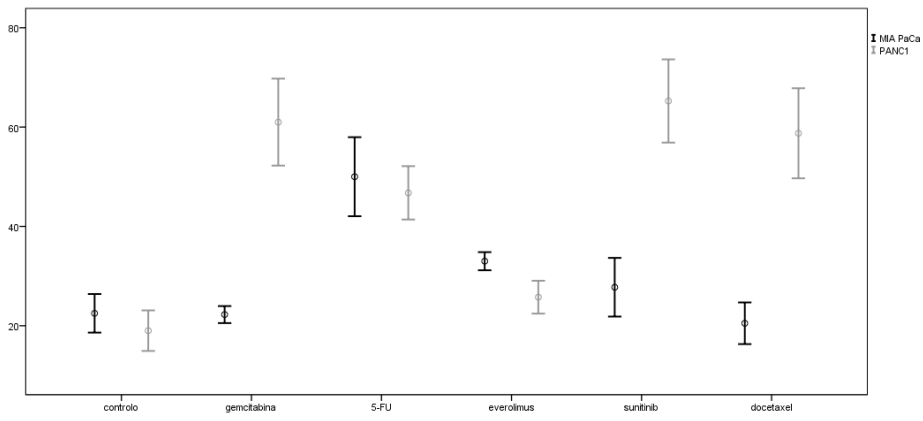
A Fig. 28 mostra a expressão dos diferentes recetores da somatostatina nas duas linhas celulares após incubação com os fármacos.



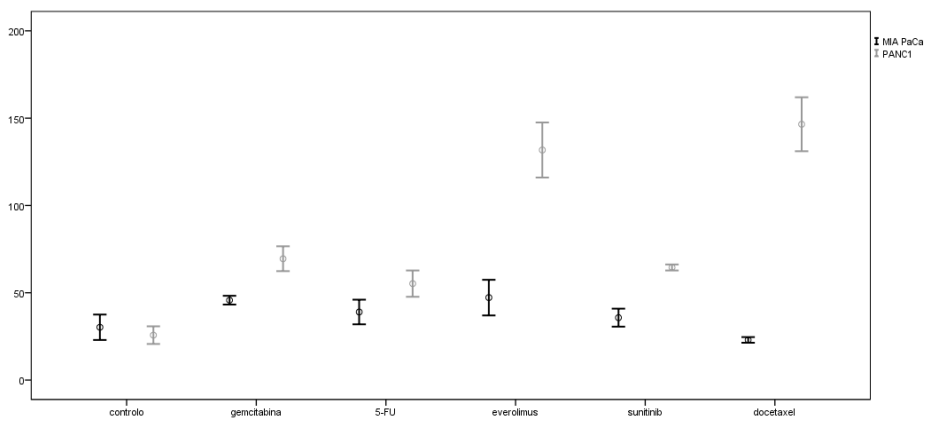
SSTR1



SSTR2a



SSTR2b



SSTR3

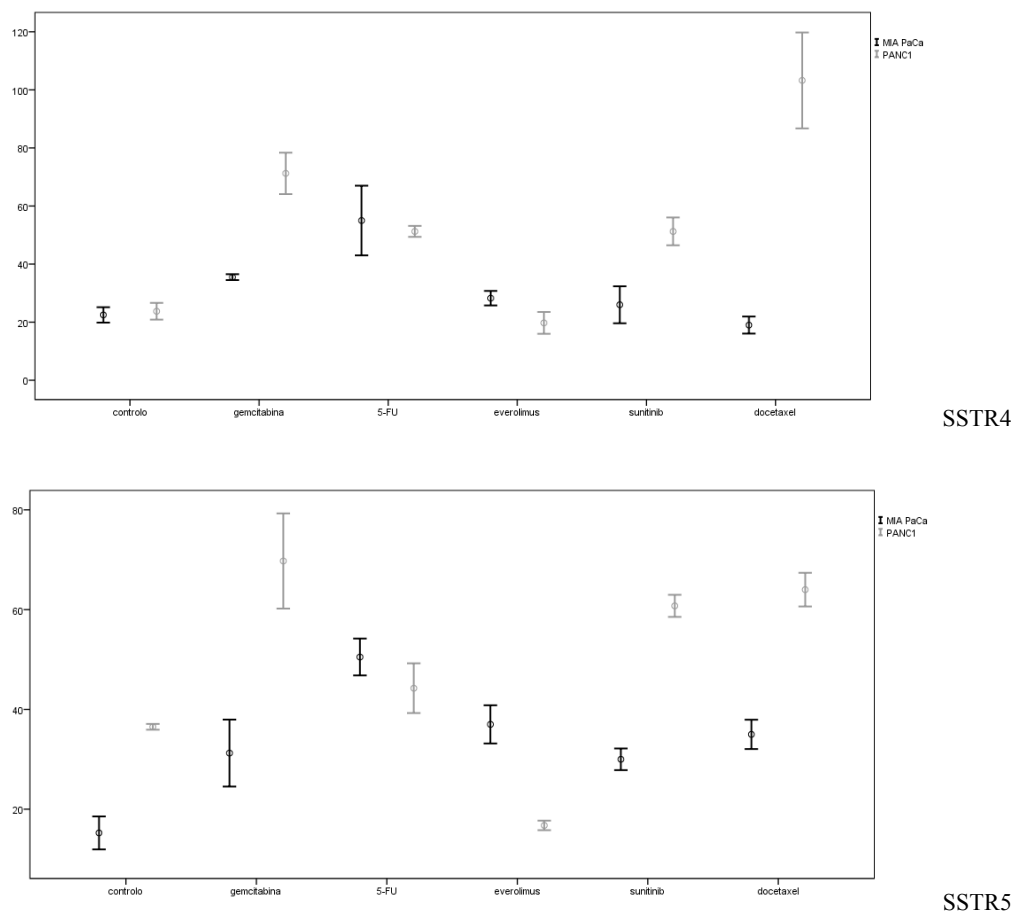


Figura 28 - Comparação da expressão dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 entre as linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, em função do controlo e dos fármacos gemcitabina, 5-FU, everolimus, docetaxel e sunitinib.

A Tabela 31 descreve os resultados estatísticos da comparação da expressão dos recetores de somatostatina entre as duas linhas celulares para cada fármaco.

Tabela 31 - Comparação estatística entre a expressão dos recetores de somatostatina nas linhas celulares MIA Paca-2 e PANC-1 após incubação com os fármacos

	SSTR1	SSTR2a	SSTR2b	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Gemcitabina	$p = 0,020$	$p = 0,020$	$p = 0,021$	$p = 0,020$	$p = 0,018$	$p = 0,021$
5-FU	$p = 0,108$	$p = 0,245$	$p = 0,468$	$p = 0,020$	$p = 1,000$	$p = 0,110$
Everolimus	$p = 0,056$	$p = 0,021$	$p = 0,020$	$p = 0,020$	$p = 0,028$	$p = 0,019$
Sunitinib	$p = 0,021$	$p = 0,020$	$p = 0,020$	$p = 0,019$	$p = 0,020$	$p = 0,021$
Docetaxel	$p = 0,021$	$p = 0,021$	$p = 0,021$	$p = 0,020$	$p = 0,021$	$p = 0,021$

5.8. Estudos de captação após modulação celular com citostáticos

Nesta parte do trabalho experimental pretendíamos saber se uma prévia incubação das células com os fármacos seleccionados aumentava a captação do radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-TATE.

O Gráfico 35 traduz os resultados dessa captação para a linha MIA PaCa-2.

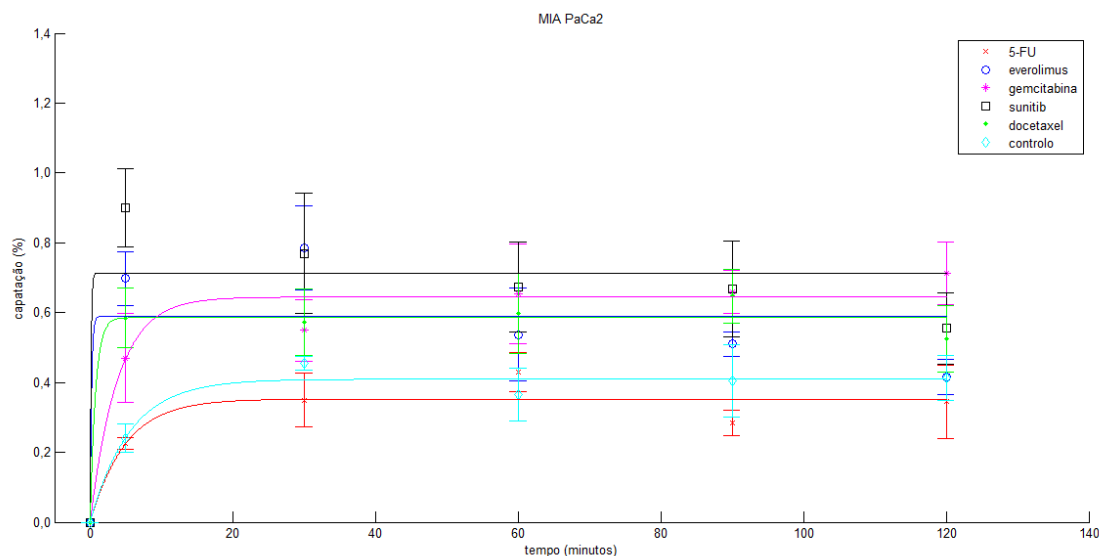


Gráfico 35 - Estudos de captação com 25 μCi de ^{177}Lu -DOTA-TATE na linha celular MIA PaCa-2, após incubação destas células durante 24 h com os citostáticos gemcitabina (500 μM), 5-FU (120 μM), everolimus (1 μM), sunitinib (0,01 μM) e docetaxel (0,005 μM). O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o desvio padrão.

Na Tabela 32, mostram-se os valores e respetivos intervalos de confiança das constantes A e λ da função, $y = A(1 - e^{-\lambda t})$, que foi usada para ajustar os valores experimentais.

Tabela 32 - Valores e intervalos de confiança das constantes A e λ nos estudos de captação da linha MIA PaCa-2, após incubação com o IC50 das 24h dos citostáticos

Fármaco	A	λ	R ²
5-FU	0,35 IC95% [0,28;0,43]	0,20 IC95% [-0,03;0,44]	0,91
Everolimus	0,59 IC95% #	5,14 IC95% #	0,76
Gemcitabina	0,65 IC95% [0,56;0,73]	0,26 IC95% [0,06;0,46]	0,96
Sunitib	0,71 IC95% #	8,07 IC95% #	0,86
Docetaxel	0,59 IC95% [0,52; 0,65]	1,34 IC95% [-36,34; 39,01]	0,97
Controlo	0,41 IC95% [0,36; 0,46]	0,18 IC95% [0,07; 0,26]	0,97

#Não foi possível apurar o intervalo de confiança (IC) devido a problemas associados à técnica automática de otimização.

Na linha MIA PaCa-2, com exceção do 5-FU, há aumento da captação do radiofármaco ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE após incubação com os citostáticos. A captação do ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE, após incubação com o 5-FU, é inferior à do controlo.

O Gráfico 36 traduz os resultados da captação com a linha PANC-1.

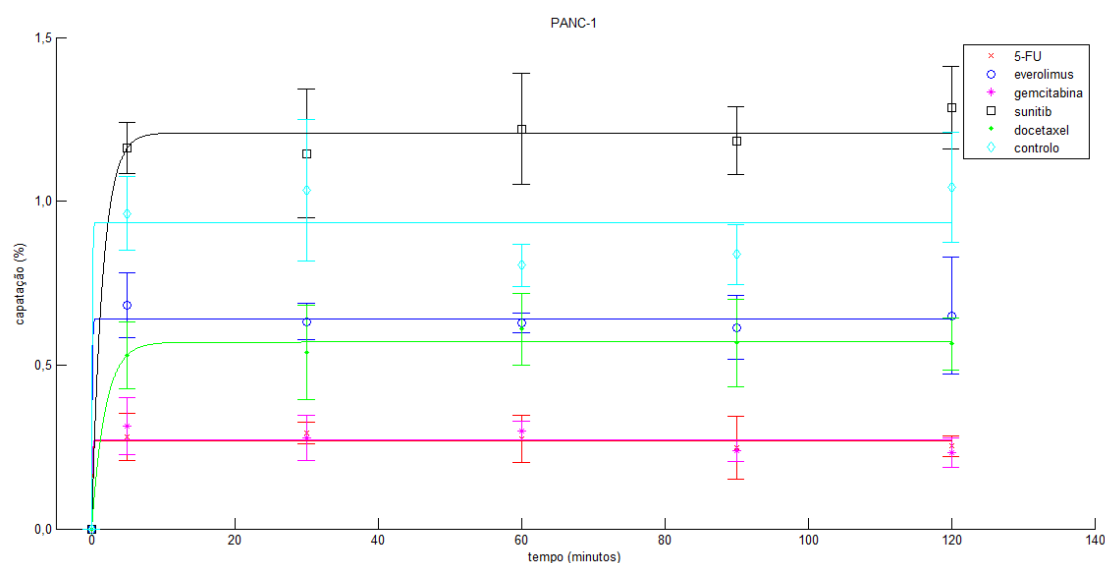


Gráfico 36 - Estudos de captação com 25 µCi de ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE na linha celular PANC-1, após incubação destas células durante 24 h com os citostáticos gemcitabina (500µM), 5-FU (120µM), everolimus (1µM), sunitinib (0,01µM) e docetaxel (0,005µM). O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o desvio padrão.

Na Tabela 33, mostram-se os valores e respetivos intervalos de confiança das constantes A e λ da função, $y = A(1 - e^{-\lambda t})$, que foi usada para ajustar os valores experimentais.

Tabela 33 - Valores e intervalos de confiança das constantes A e λ nos estudos de captação da linha PANC-1, após incubação com o IC50 das 24h dos citostáticos

Fármaco	A	λ	R ²
5-FU	0,26 IC95% #	11,44 IC95% #	0,98
Everolimus	0,64 IC95% #	12,65 IC95% #	0,99
Gemcitabina	0,27 IC95% #	12,56 IC95% #	0,92
Sunitib	1,21 IC95% [1,14; 1,28]	0,65 IC95% [-0,03; 1,34]	0,99
Docetaxel	0,57 IC95% [0,53; 0,61]	0,53 IC95% [0,14; 0,93]	0,99
Controlo	0,94 IC95% [0,78; 1,09]	3,64 IC95% #	0,94

Na linha PANC-1, só com o sunitinib há aumento da captação do radiofármaco ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE. A percentagem de captação do sunitinib é superior à verificada com a linha MIA PaCa-2. A captação do ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE, após incubação com os restantes fármacos, é inferior à do controlo.

Através do método de exclusão do azul tripano, os resultados mostraram uma viabilidade celular sempre acima de 95% para ambas as linhas celulares utilizadas.

5.9. Perfil morfológico dos xenotransplantes

A Tabela 34 apresenta os resultados da imunofenotipagem dos xenotransplantes obtidos com as células MIA PaCa-2 e PANC-1 com os marcadores imunohistoquímicos previamente selecionados.

Tabela 34 - Imunofenotipagem dos xenotransplantes de MIA PaCa-2 e PANC-1

Marcador	Morfologia	Linha MIA PaCa-2	Xenotransplantes MIA PaCa-2			Linha PANC-1	Xenotransplantes PANC-1			
			R5	R6	R7		R1	R2	R3	R4
CK5.6	Células grandes (isoladas)	+++	+	+	+	++	-	+	+	-
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	++	++	++	++	++
	Células pequenas (mórula)	++	+++	+++	++	-	+	+	+	+
AE1/AE3	Células grandes (isoladas)	+++	++	+	++	++	+	+	+	+
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	++	++	++	++	++
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
E-caderina	Células grandes (isoladas)	+++	+	+	+	-	-	+	+	+
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	-	++	++	++	++
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	+++	+++	-	+	+	+	+
Vimentina	Células grandes (isoladas)	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	++	++	++	++	++
	Células pequenas (mórula)	++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
Cromogranina A	Células grandes (isoladas)	-/+	+	-	+	+	+	+	+	+
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	+	+++*	+++*	+++*	+++*
	Células pequenas (mórula)	+++	+++*	+++*	+++*	-	+	+	+	+
CD 56	Células grandes (isoladas)	-/+	++	+	+	+	+	++	+	+
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	+	++	+	++	++
	Células pequenas (mórula)	-	++	++	+++	-	+	+	+	+
Sinaptofisina	Células grandes (isoladas)	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	-	+	+	++	++
	Células pequenas (mórula)	-	++	++	+++	-	+	+	++	++
SSTR2	Células grandes (isoladas)	+++	+	-	+	+++	-	+	-	+
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	+	++	+++	++	++
	Células pequenas (mórula)	+++	+++	++	++	++	-	+	-	+
NTR1	Células grandes (isoladas)	++	+++	++	++	-	-	-	+	+
	Células intermédias (estreladas)	X	X	X	X	-	-	++	+	+
	Células pequenas (mórula)	++	+	+	+	-	-	+	+	-

Cut off: - (0%); + (<10%); ++ (10-75%); +++ (>75%); X = ausente; *coloração nuclear da cromogranina; **citoplasma polarizado; R = ratinho.

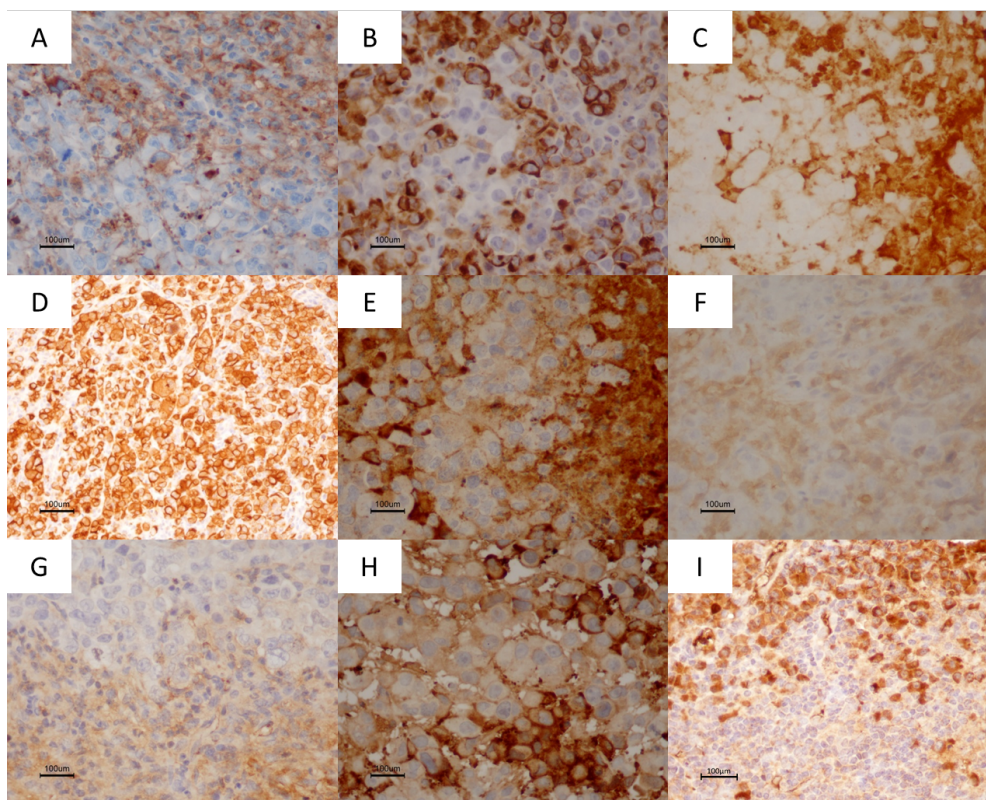


Figura 29 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica dos xenotransplantes. **A:** CK5.6 x400; **B:** AE1/AE3 x400; **C:** E-caderina x400; **D:** Vimentina x200; **E:** Cromogranina A x400; **F:** CD56 x400; **G:** Sinaptofisina x400; **H:** SSTR2 x400; **I:** NTR1 x400. Barra de escala: 100 µm.

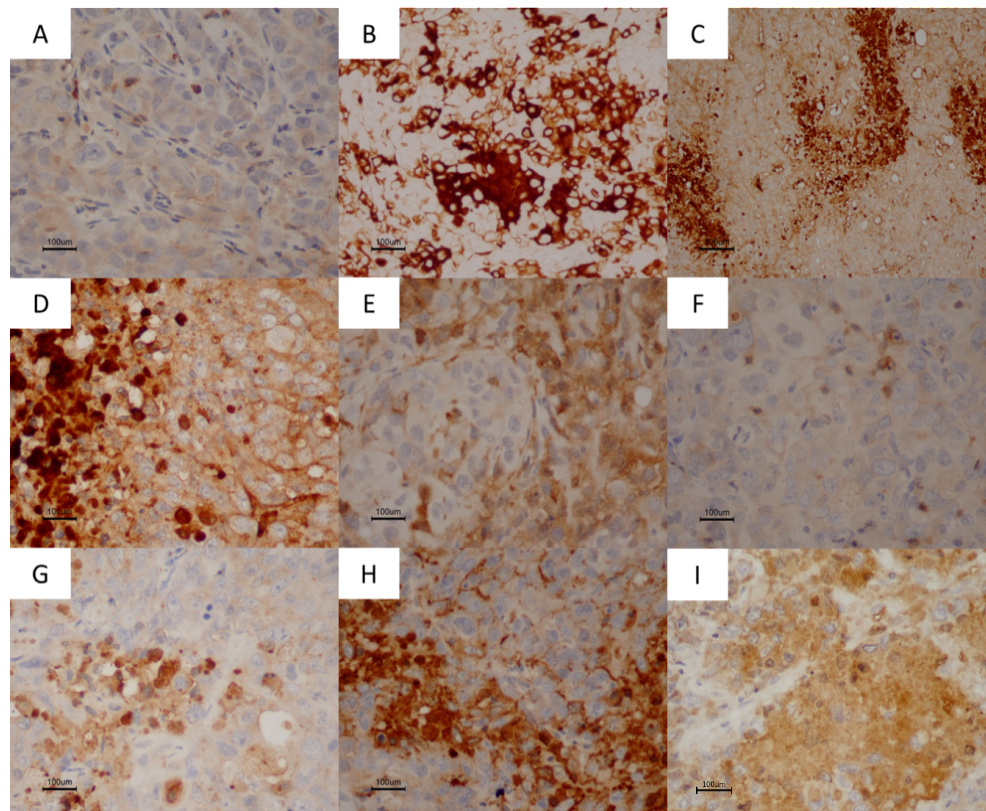


Figura 30 - PANC-1: Imunohistoquímica dos xenotransplantes. **A:** CK5.6 x400; **B:** AE1/AE3 x200; **C:** E-caderina x100; **D:** Vimentina x400; **E:** Cromogranina A x400; **F:** CD56 x400; **G:** Sinaptofisina x400; **H:** SSTR2 x400; **I:** NTR1 x400. Barra de escala: 100 µm.

Análise estatística

As Tabelas 35 a 38 mostram a mediana dos resultados para os diferentes marcadores nos xenotransplantes e para cada linha celular. Nos xenotransplantes os marcadores foram avaliados em diferentes ratinhos (MIA PaCa-2, n=3; PANC-1, n=4) mas na linha celular só foi efetuada uma avaliação. Por esta razão, o valor de p foi determinado por um teste não paramétrico para uma amostra.

Os valores indicados reportam-se apenas às células grandes e às células intermédias.

MIA PaCA-2

Células grandes

Tabela 35 - Mediana dos resultados de imunofenotipagem das células grandes nos xenotransplantes de MIA PaCa-2 e na linha celular correspondente

Marcador	Linha celular	Xenotransplantes	p
CK5.6	+++	+	0,002
AE1/AE3	+++	++	0,002
E-caderina	+++	+	0,002
Vimentina	+++	+++	1,000
Cromogranina A	-/+	+	0,011
CD 56	-/+	+	0,002
Sinaptofisina	+	+	1,000
SSTR2	+++	+	0,002
NTR1	++	++	0,317

Nas células grandes da linha MIA PaCa-2 observam-se diferenças estatisticamente significativas entre a linha celular e as células provenientes dos xenotransplantes, para os marcadores CK5.6, AE1/AE3, E-caderina e SSTR2, a favor da linha celular, e para o marcador CD56, a favor das células dos xenotransplantes.

Células pequenas

Tabela 36 - Mediana dos resultados de imunofenotipagem das células pequenas nos xenotransplantes de MIA PaCa-2 e na linha celular correspondente

Marcador	Linha celular	Xenotransplantes	<i>p</i>
CK5.6	++	+++	0,003
AE1/AE3	+++	+++	1,000
E-caderina	+++	+++	1,000
Vimentina	++	+++	0,002
Cromogranina A	+++	++	0,005
CD 56	-	++	0,002
Sinaptofisina	-	++	0,002
SSTR2	+++	++	0,003
NTR1	++	+	0,002

Nas células pequenas da linha MIA PaCa-2 observam-se diferenças estatisticamente significativas entre a linha celular e as células provenientes dos xenotransplantes, para o marcador cromogranina A e NTR1, a favor da linha celular, e para os marcadores CK5.6, vimentina, CD56, e sinaptofisina, a favor das células dos xenotransplantes.

PANC-1

Células grandes

Tabela 37 - Mediana dos resultados de imunofenotipagem das células grandes nos xenotransplantes de PANC-1 e na linha celular correspondente

Marcador	Linha celular	Xenotransplantes	<i>p</i>
CK5.6	++	+	0,002
AE1/AE3	++	+	0,001
E-caderina	-	+	0,001
Vimentina	++	++	1,000
Cromogranina A	+	+	1,000
CD 56	+	+	0,317
Sinaptofisina	-	+	0,001
SSTR2	+	-/+	0,003
NTR1	-	-	0,157

Nas células grandes da linha PANC-1 observam-se diferenças estatisticamente significativas entre a linha celular e as células provenientes dos xenotransplantes, para os marcadores CK5.6, AE1/AE3 e SSTR2, a favor da linha celular, e da E-caderina e da sinaptofisina, a favor das células dos xenotransplantes.

Células pequenas

Tabela 38 - Mediana dos resultados de imunofenotipagem das células pequenas nos xenotransplantes de PANC-1 e na linha celular correspondente

Marcador	Linha celular	Xenotransplantes	<i>p</i>
CK5.6	-	+	0,001
AE1/AE3	+++	+++	1,000
E-caderina	-	+	0,001
Vimentina	+++	+	0,001
Cromogranina A	-	+	0,001
CD 56	-	+	0,001
Sinaptofisina	-	+	0,001
SSTR2	++	-/+	0,002
NTR1	-	-/+	0,003

Nas células pequenas da linha PANC-1 observam-se diferenças estatisticamente significativas entre as células da linha celular e as células provenientes dos xenotransplantes, para o marcador vimentina e SSTR2, a favor da linha celular, e para os marcadores CK5.6, E-caderina, cromogranina A, CD56, sinaptofisina e NTR1, a favor das células dos xenotransplantes.

6. Discussão

6.1. Perfil morfológico das linhas celulares

A caracterização fenotípica das linhas celulares permite colocar em evidência perfis moleculares das neoplasias, úteis na seleção das potencialidades terapêuticas.

6.1.1. Variedade morfológica

A observação das células MIA PaCa-2 e PANC-1 durante o processo de imunofenotipagem evidenciou, na linha MIA PaCa-2 (Tabela 13 e Fig. 2), a presença de dois tipos morfológicos de células, a variante de células grandes e a variante de células pequenas agrupadas em mórula, enquanto na linha PANC-1 (Tabela 14 e Fig. 3) se evidenciaram três tipos morfológicos de células, a variante de células grandes e isoladas, a variante de células de dimensão intermédias e estreladas, e a variante de células pequenas.

Através da técnica de citometria de fluxo tentámos esclarecer se, no caso das células da linha MIA PaCa-2, nos encontrávamos efetivamente perante duas populações celulares, e no caso das células da PANC-1, perante três populações. Os resultados evidenciaram, para a linha celular MIA PaCa-2 (Fig. 4), a presença efetiva de dois grupos de células, umas mais complexas e maiores, e outras menos complexas e mais pequenas. Na linha celular PANC-1 (Fig. 5), pelo contrário, evidenciou-se uma única população celular.

O padrão morfológico das linhas repetiu-se após modulação citostática (Tabela 26 -MIA PaCA-2 e PANC-1, Tabela 27 - MIA PaCA-2 e Tabela 28 - PANC-1). Todavia, após a modulação celular com os citostáticos gemcitabina e docetaxel, as células pequenas deixaram de se observar (Tabelas 27 e 28) nas duas linhas celulares, o que julgamos se terá devido à sua morte provocada pelos citostáticos. Também após

modulação celular com os citostáticos observamos, na linha MIA PaCa-2, o aparecimento de um terceiro grupo de células, fusiformes. Admitimos que possa tratar-se de células grandes ou pequenas, modificadas pela ação da quimioterapia.

O padrão morfológico observado nas linhas manteve-se nos xenotransplantes (Tabela 32).

Uma vez que não existem marcadores específicos de células pancreáticas tumorais, não podemos afirmar, com certeza, que estamos perante um caso de polimorfismo para a linha celular MIA PaCa-2, ou de pleomorfismo para a linha celular PANC-1. Todavia, seria estranho que, tratando-se de uma observação fortuita reportada apenas às linhas celulares, o padrão populacional se mantivesse após modulação celular com os citostáticos, ou após transplantação heterotópica, nos xenotransplantes.

6.1.2. Imunohistoquímica

Nos xenotransplantes obtidos com a linha celular MIA PaCa-2 (Tabela 34 e Fig. 29), o padrão de marcação alterou-se, passando a existir expressão de marcação para o CD56, o que acentua o fenótipo endócrino, já presente nas células da linha celular. Já nos xenotransplantes obtidos com a linha celular PANC-1 (Tabela 34 e Fig. 30), passou a existir expressão de marcadores que não se exprimiam na linha celular, como a E-caderina, a sinaptofisina e o NTR1, o que acentua o fenótipo endócrino. A cromogranina A e o SSTR2 veem a sua expressão aumentada nas células intermédias.

Se compararmos estatisticamente os resultados obtidos nos xenotransplantes e na linha celular respetiva, não deixando de realçar que os valores de p foram determinados por um teste não paramétrico para uma amostra, nas células grandes da linha celular MIA PaCa-2 (Tabela 35) observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a linha celular e as células provenientes dos xenotransplantes, para os marcadores CK5.6, AE1/AE3, E-caderina, SSTR2 e NTR1, a favor da linha celular, e para o

marcador cromogranina A e CD56, a favor das células provenientes dos xenotransplantes. Isto é, em termos gerais, podemos dizer que houve uma diminuição da expressão da maioria dos marcadores nos xenotransplantes. Nas células pequenas da linha celular MIA PaCa-2 (Tabela 36) observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as células da linha celular e as células provenientes dos xenotransplantes, para o marcador cromogranina A, SSTR2 e NTR1, a favor da linha celular, e para os marcadores CK5.6, vimentina, CD56 e sinaptofisina, a favor das células dos xenotransplantes. Nas células grandes da linha celular PANC-1 (Tabela 37) observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as células da linha celular e as células provenientes dos xenotransplantes, para os marcadores CK5.6, AE1/AE3, e recetores SSTR2, a favor da linha celular e da E-caderina e da sinaptofisina, a favor das células dos xenotransplantes. Nas células pequenas da linha celular PANC-1 (Tabela 38) observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as células da linha celular e as células provenientes dos xenotransplantes, para o marcador vimentina e para o recetor SSTR2, a favor da linha celular, e para os marcadores CK5.6, E-caderina, cromogranina A, CD56, sinaptofisina e NTR1, a favor das células dos xenotransplantes.

Concluimos assim que, *in vivo*, a expressão dos marcadores e recetores pode variar, com diminuição ou aumento e que, inclusivamente, podem aparecer marcadores e recetores antes não expressos.

Estes diferentes padrões de expressão *in vitro* e *in vivo* já foram observados, por outros autores, com estes e outros marcadores e em várias linhas celulares (Neureiter et al., 2005) e parecem explicar-se pelo facto das linhas celulares em estudo terem capacidade para *in vivo* alterarem o padrão de expressão dos seus marcadores, num processo associado à diferenciação molecular que ocorre durante o desenvolvimento embrionário do pâncreas (Neureiter et al., 2005).

6.1.3. Fenótipo de transição epitelial-mesenquimal

Do ponto de vista da caracterização imunohistoquímica ambas as linhas demonstraram expressar marcadores epiteliais como a CK5.6 e a AE1/AE3 e um marcador de mesênquima como a vimentina, o que permite caracterizá-las como células epitélio-mesenquimatosas. A presença destes marcadores manteve-se nos xenotransplantes e após tratamento com os citostáticos, com ligeiras diferenças globais de expressão.

A ativação de um programa de transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um mecanismo essencial para a aquisição de um fenótipo maligno pelas células cancerosas epiteliais. As células que apresentam um fenótipo EMT constituem a frente invasiva que precede a cascata da invasão-metastização (Beuran et al., 2015).

O que caracteriza a EMT é o ganho de marcadores de mesênquima, como a vimentina, e a perda da molécula de adesão epitelial homotípica E-caderina (Shirkoohi, 2013). Quer as células da linha celular MIA PaCa-2, quer as da linha celular PANC-1 expressam vimentina. Este marcador mantém-se após incubação com os citostáticos, assim como nos xenotransplantes. Não sabemos qual seria a marcação das células pequenas de ambas as linhas, após tratamento com gemcitabina e docetaxel, porque não as identificámos.

As células da linha celular PANC-1 não apresentaram marcação com a E-caderina. Todavia, nos xenotransplantes (Tabela 34) ocorreu uma marcação ligeira (+) nas células grandes e nas células pequenas, e uma marcação moderada (++) nas células intermédias. Após incubação com os citostáticos, apareceu apenas marcação intensa (+++) nas células pequenas após a exposição ao sunitinib, e marcação moderada (++) nas células grandes e isoladas após exposição à gemcitabina.

No cancro do pâncreas, o fenótipo EMT contribui para a resistência à quimioterapia, enquanto que os fatores de transcrição que coordenam o seu aparecimento têm sido correlacionados com um agravamento do grau histológico e com o mau prognóstico nos carcinomas esofágico, gástrico e colorretal (Arumugam et al., 2009b; Cates et al., 2009; Jiang et al., 2015).

Relatórios de ensaios migratórios demonstraram que a migração das células da linha celular PANC-1 cultivadas em placas *transwell*[®] que utilizam uma membrana porosa de policarbonato e que são revestidas com colagénio do tipo I, era superior à das células da linha celular MIA PaCA-2 (Deer et al., 2010). Por outro lado, o comportamento invasivo estudado, usando culturas em *matrigel*[®] (mistura proteica gelatinosa) também foi demonstrado, para as duas linhas celulares, MIA PaCA-2 e PANC-1, embora não tenha sido conclusivo (Deer et al., 2010).

Foram já observadas associações significativas entre os marcadores de EMT, como a E-caderina e a vimentina, e os marcadores de células estaminais como o CD24, o CD44 e o CD133 nos adenocarcinomas pancreáticas ductais, como provam estudos anteriores (Mani et al., 2008). De facto, foi demonstrado que a EMT pode induzir a desdiferenciação em células estaminais pancreáticas (Rhim, 2013), e que o grau de EMT se correlaciona com proporções diferentes de células CD24⁺, CD44⁺ e CD133⁺ (Zhang et al., 2012).

Os nossos resultados indicam que ambas as linhas celulares de carcinoma do pâncreas estudadas possuem potencial EMT mas, este potencial, por ausência da E-caderina, é superior na linha PANC-1.

6.1.4. Células estaminais

As células estaminais do cancro representam uma população heterogénea composta por diferentes clones, com capacidades favoráveis a uma maior proliferação,

resistência à apoptose, resposta à lesão do ADN, resistência à hipoxia, invasão e metastização (Rao and Mohammed, 2015).

Vários marcadores de células estaminais podem coexistir em diferentes tipos de tumor, mas é possível que cada tumor tenha um perfil específico (Bhagwandin and Shay, 2009). Assim, estes marcadores CD24, CD44, CD326 e CD133 estão presentes em tumores pancreáticos mas também noutros tumores, sendo possível que exista uma combinação específica de marcadores, ainda não conhecida, para cada tumor, e que permita caracterizá-los individualmente. Os marcadores que selecionámos para caracterização das células estaminais pancreáticas foram o triplete CD24CD44CD326/ESA e o CD133.

O CD24, o CD44 e o CD133, como moléculas de adesão das células estaminais, correlacionam-se com várias funções de sinalização. As células que expressam simultaneamente o CD24, o CD44 e o CD326, ou seja, células com fenótipo CD24⁺CD44⁺CD326⁺, compreendem cerca de 0,2 a 0,8% de todas as células tumorais pancreáticas humanas e têm potencialidade elevada de carcinogénese (Garcia-Silva et al., 2013). Por outro lado, as células que expressam o CD133, com fenótipo CD133⁺, constituem cerca de 1 a 3% das células tumorais pancreáticas, e são capazes de originar tumores com elevado potencial de metastização (Lee et al., 2011).

No nosso trabalho experimental, as células da linha celular MIA PaCa-2 revelaram ter uma população heterogénea de células estaminais (Fig. 4), com um fenótipo CD24⁻CD44^{+/++}CD326^{-/+} e CD133/1⁻, com expressão mais elevada de CD44⁺⁺ na população de células grandes. Também verificámos que a população MIA PaCa-2 tinha duas subpopulações celulares CD44 e CD326 com percentagem relevante, o fenótipo CD44⁺CD326⁻ que correspondia a 48% e o fenótipo CD44⁺CD326⁺ que correspondia a 35,5%.

Quanto à linha celular PANC-1, evidenciou também uma heterogeneidade populacional (Fig. 5), que se distribuía fundamentalmente por duas populações, uma com fenótipo CD24^{-/+}CD44⁺CD326^{-/+} e outra com fenótipo CD133/1⁻.

As células tumorais com o fenótipo CD24⁺CD44⁺CD326⁺ têm a capacidade de se autorrenovar, gerar descendência diferente, e recapitular o fenótipo do tumor de onde derivaram (Huang et al., 2008). Porém como foi demonstrado num outro estudo, as células que não expressavam os três marcadores não foram capazes de iniciar um cancro do pâncreas até que cerca de 10⁴ células fossem implantadas (Li et al., 2007). Em relação à tumorigenicidade do fenótipo CD24⁺CD44⁺CD326⁺, verificou-se que células que expressavam apenas o marcador CD24⁺ foram capazes de originar tumores em 50% de ratinhos NOD/SCID (6 tumores em 12 animais) depois de terem sido injetados subcutaneamente (s.c.), nos flancos, com 100 células. Algo de semelhante se verificou com células que expressavam dupla marcação, fenótipo CD44⁺CD326⁺, mas neste caso o êxito foi somente de 25% (4 tumores em 16 animais). Adicionalmente, à medida que se aumentava o número de células injetadas (500 células, 1 000 células e 10 000 células) com o fenótipo de dupla marcação CD44⁺CD326⁺, aumentou o seu potencial tumorigénico quando comparado com o potencial tumorigénico das células com fenótipo CD44⁺ isolado. De modo complementar, as células CD24⁻ mostraram ser menos tumorigénicas do que as células CD24⁺, pois só um em 16 animais (êxito de 6,25%) desenvolveu tumor quando injetados com 100 células. Já em relação à expressão de CD326, após injeção s.c. de 500 células, os resultados mostraram um êxito de 44,4% (8 tumores em 18 animais) para as células com fenótipo CD326⁺ e de 0,05% (1 tumor em 18 animais) para as células com fenótipo CD326⁻. Quanto às células com fenótipo CD24⁻ necessitaram de 1 000 células para gerar um tumor (0,06%), quando injetadas em 16 animais (Huang et al., 2008; Li et al., 2007).

Podemos assim presumir que as células da linha celular PANC-1, com o fenótipo $CD24^+CD44^+CD326^+$ serão mais tumorigénicas do que as células da linha celular MIA PaCa-2, com o fenótipo $CD24^-CD44^+CD326^+$ e que de entre as células MIA PaCa-2 a subpopulação $CD44^{++}CD326^+$ tem maior potencial tumorigénico do que a subpopulação $CD44^+CD326^-$.

O marcador de superfície CD133 foi descrito pela primeira vez como estando associado a propriedades de célula estaminal, no cérebro e no cancro do cólon (Lee et al., 2011). Resultados posteriores revelaram que 500 células com fenótipo $CD133^+$ quando injetadas em ratinhos NOD/SCID eram capazes de originar tumores (Fitzgerald and McCubrey, 2014). Foi também demonstrado que as células $CD133^+$ tinham um potencial tumorigénico e um potencial de metastização muito mais elevado do que as células $CD44^+$, sugerindo que a expressão do CD133 correspondia a um comportamento agressivo do cancro do pâncreas (Hermann et al., 2007). Sabe-se também que o fenótipo de células estaminais $CD133^+CXCR4^+$ é essencial à metastização (Zhan et al., 2015).

No nosso trabalho experimental, nem as células da linha celular MIA PaCa-2, nem as da linha celular PANC-1 expressavam o CD133, o que parece reduzir a sua capacidade para metastizarem.

Apesar destes resultados, devemos salientar que a presença de células estaminais não pode ser inferida apenas com base na expressão dos marcadores seleccionados, até porque se sabe que a expressão dos marcadores CD24, CD44 e CD326 varia com o microambiente ou nicho (Wei et al., 2011). Assim, estudos funcionais de confirmação, como ensaios de formação de esferas (Wang et al., 2013) ou de tumorigénese em ratinhos imunocomprometidos (Jaiswal et al., 2012; Magee et al., 2012) seriam necessários.

6.2. Perfil genético das linhas celulares

A análise dos genes *KRAS*, *CDKN2A/p16^{INK4A}*, *TP53*, *SMAD4/DPC4* e da presença ou não de *MSI* teve como objetivo localizar as mutações envolvidas por forma a identificar possíveis fontes de resistência à quimioterapia e à radioterapia.

O *KRAS* é o oncogene mais frequentemente identificado no adenocarcinoma ductal pancreático sendo observado em cerca de 90% destes tumores. As mutações somáticas ocorrem geralmente em *hotspots* específicos, mais frequentemente no codão 12 e correlacionam-se com o aumento da produção de mucinas pelas células epiteliais afetadas (Agarwal and Saif, 2014).

Para o gene *KRAS* estudaram-se três codões: o 12, o 13 e o 61. As células das linhas celulares MIA PaCA-2 e PANC-1 mostraram mutações no codão 12 do gene *KRAS*.

A linha celular MIA PaCa-2 apresentou (Fig. 6) uma mutação *missense*, sem heterozigotia, no codão 12, p.G12C, com substituição do aminoácido glicina pelo aminoácido cisteína, devido à transversão de uma guanina (G) por uma timina (T), GGT>TGT. A linha celular PANC-1 também apresentou (Fig. 7) uma mutação *missense* no codão 12, com substituição da glicina pelo ácido aspártico, em heterozigotia, devido à transição de uma guanina por uma adenina (A) (p.G12D; GGT>GAT). Estas duas mutações são as mais frequentemente observadas (Saiki and Horii, 2014).

Como já referimos, o codão 12 é um codão *hotspot* conhecido, por interferir com a função GTPase do *KRAS*, mantendo a molécula no estado GTP-ligado, o que permite a ativação ininterrupta, a jusante, da cascata de vias efetoras, como por exemplo a via *MAPK/ERK*, já anteriormente referida, também conhecida como *Ras-Raf* (*Raf*, *rapidly accelerated fibrosarcoma kinases*)-*MEK* (também conhecida como *MAPKK*, *mitogen-*

activated protein kinase kinase)-ERK, e a via *PI3K* (*phosphatidylinositol 3-kinase*)/*PTEN* (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*)/*Akt* (ou via *PI3K Akt*, que é uma proteína cinase B (*PKB, protein kinase B*))/*mTORC1* (*mammalian target of rapamycin complex 1*)/*GSK-3* (*glycogen synthase kinase 3*) (Maertens and Cichowski, 2014). Trata-se de uma cadeia de proteínas celulares que fazem a ligação entre um sinal proveniente de um recetor na superfície celular com o ADN do núcleo. Cada via, inclui muitas proteínas numa sequência de encadeamento “em cascata”, incluindo a MAPK que comunicam entre si, adicionando grupos fosfato às proteínas vizinhas, ligando-as ou desligando-as (Jones et al., 2008). As mutações no gene *KRAS* provocam desregulação destas vias e conferem resistência aos fármacos, resistência à apoptose, crescimento tumoral e metastização agressivos, e mau prognóstico (Fitzgerald et al., 2015).

As células tumorais com o *KRAS* mutado são também mais resistentes à radiação do que as células com o *KRAS* selvagem (*wt, wild type*). Alguns estudos têm demonstrado que os inibidores da farnesil-transferase (*FPT, farnesyl protein transferase inhibitors*), uma enzima essencial à atividade da RAS, evitam o processo pós-tradução do *KRAS*, essencial à sua localização na membrana celular, e sensibilizam as células pancreáticas com *KRAS* mutado para a radiação (Alcock et al., 2002; Macdonald et al., 2005; Moorthy et al., 2013; Porzner and Seufferlein, 2011). Numerosas proteínas inibidoras da farnesil transferase têm sido desenvolvidas nos últimos 20 anos. Todavia, a sua eficácia tarda em demonstrar-se, uma vez que existem inúmeras proteínas das vias de sinalização referidas, que estão relacionadas com a RAS, que são também afetadas pela ação dos inibidores da farnesil-transferase (Guo et al., 2013).

As mutações no *KRAS* correlacionam-se também com um aumento da produção de mucinas pelas células epiteliais afetadas (Ji et al., 2009), o que, como já mencionámos, promove a transformação evolutiva das lesões precursoras de cancro.

As mutações no *KRAS* têm sido associadas a uma redução da sobrevivência em doentes com adenocarcinoma ductal pancreático, especialmente quando associadas a outras mutações genéticas, como por exemplo a do gene *CDKN2A/p16^{INK4}* (Rachakonda et al., 2013). Os genes supressores tumorais mais implicados no adenocarcinoma pancreático ductal, por ordem de frequência, são o *CDKN2A/p16^{INK4A}* (95%), *TP53* (75%) e *SMAD4/DPC4* (55%) (Reid et al., 2014).

Neste estudo, a amplificação dos exões 1-3 do gene *CDKN2A/p16^{INK4A}* permitiu identificar (Fig. 8) a existência de uma deleção em homozigotia, incluindo os três exões, em ambas as linhas celulares.

O gene *CDKN2A/p16^{INK4A}*, localizado no cromossoma 9p21, é um importante regulador negativo do ciclo celular, que codifica duas proteínas supressoras tumorais, a P16 (INK4) e P14 (ARF). Ambas as proteínas têm um primeiro exão independente, exão 1- α e exão 1- β , respetivamente, mas partilham os exões 2 e 3, e são traduzidas em diferentes grelhas de leitura (*reading frames*), a partir do segundo exão comum (Harinck et al., 2012). A maioria das mutações do *CDKN2A/p16^{INK4A}* são mutações *missense* localizadas nas sequências codificantes dos exões 1 e 2, comum a ambos os supressores tumorais P16 (INK4) e P14 (ARF) (Ghiorzo, 2014). Estas proteínas estão envolvidas no controlo negativo da proliferação celular. A P16 (INK4), por exemplo, inibe a cinase 4/6 dependente das ciclinas (*Cdk4/6, cyclin-dependent kinase 4/6*), o que mantém a proteína do retinoblastoma (RB) no seu estado ativo, desfosforilado e este, por sua vez, efetua uma inibição a jusante do fator de transcrição E2F, o que induz paragem do ciclo celular em G1. A P14 (ARF) inibe a MDM2 (*mouse double minute 2*

homolog), a proteína que mantém o *TP53* em níveis baixos promovendo, dessa forma, a síntese da P53, a qual promove a ativação da P21, que depois se liga a complexos de cinases dependentes da ciclina, essenciais à progressão do ciclo celular nas fases G1/S e G2/M. Quer a ação da P16 (INK4) quer a da P14 (ARF), têm como finalidade a prevenção da transformação neoplásica (McWilliams et al., 2011).

A incidência de cancro pancreático está aumentada em famílias afetadas por síndromes hereditárias de melanoma ou síndrome do melanoma e múltiplos nevos atípicos familiares (*FAMMM*, *familial atypical multiple mole melanoma*), uma doença autossômica dominante caracterizada pela ocorrência de mais de 50 nevos atípicos e melanoma maligno em dois ou mais familiares diretos, de primeiro ou de segundo grau. Cerca de 10% dos melanomas têm um padrão familiar e mutações no gene supressor tumoral *CDKN2A/p16^{INK4A}* foram identificadas em cerca de 30% a 40% destas famílias (Goldstein et al., 2006). Todavia, foram também encontradas mutações no gene *CDKN2A/p16^{INK4A}* em famílias com cancro do pâncreas hereditário sem melanoma associado (Bartsch et al., 2010).

As mutações do *CDKN2A* desempenham um papel importante no desenvolvimento do cancro do pâncreas. E este risco aumenta nos fumadores portadores dessas mutações (Raimondi et al., 2007).

Como já referimos, as mutações somáticas no gene *TP53* são observadas em cerca de 75% dos adenocarcinomas pancreáticos ductais e são habitualmente o resultado de uma mutação intragénica seguida de perda do alelo selvagem. A proteína P53 é um fator de transcrição que induz a expressão de inibidores do ciclo celular, como por exemplo a P21, para permitir a reparação do ADN (Riley et al., 2008). Quando a lesão não fica reparada, a P53 induz apoptose, por ativação da transcrição de genes pro-apoptóticos, como por exemplo o gene *PUMA* (*P53 upregulated modulator of apoptosis*), e também

por um mecanismo independente da transcrição (Nakano and Vousden, 2001). Este envolve a interação direta da P53 com a mitocôndria, provocando a permeabilização da sua membrana externa com libertação do citocromo c, o que desencadeia a apoptose (Moll et al., 2006). A P53 também inibe a autofagia (Tasdemir et al., 2008), o que é considerado como um processo oncogénico, já que induz a instabilidade do genoma, e morte por necrose, em vez de morte por apoptose (Green and Kroemer, 2009).

A função do *TP53* está também alterada nas células das duas linhas celulares estudadas, as MIA PaCa-2 e as PANC-1, por mutações *missense*. Relativamente aos cinco exões do gene *TP53* analisados (4, 5, 6, 7 e 8), considerados como *hotspot* de mutações, apenas foram encontradas mutações em três destes exões.

As células da linha celular MIA PaCa-2 apresentaram (Fig. 9) uma mutação *missense* sem heterozigotia, no exão 7, com substituição da arginina na posição 248 por triptofano (p.R248W), devido à transição de uma citosina (C) por uma timina (T) (CGG>TGG). As células da linha celular PANC-1 revelaram duas variações *missense* em dois exões distintos, uma no exão 4 (Fig. 10), que compreende a um polimorfismo comum, com substituição da prolina na posição 72 por arginina (p.P72R) devido à transversão de uma citosina por uma guanina (CCC>CGC), e outra no exão 8 (Fig. 11), com substituição da arginina na posição 273 por uma histidina (p.R273H), por transição de uma guanina por uma adenina (CGT>CAT).

A mutação no exão 4, localizada no domínio rico em prolina do gene *TP53*, traduz-se em diferenças na indução da apoptose (Rivlin et al., 2011). As duas variantes patogénicas, nos exões 7 e 8, correspondem ao domínio de ligação ao ADN do gene *TP53*, e sabe-se que alteram a sua função como ativador da transcrição. Existem também evidências de que algumas mutações no gene *TP53*, incluindo a já referida R273H, podem induzir uma ampliação dos efeitos habituais, como demonstrado em

ratinhos *knock-in* com esta mutação, que mostraram aumento do número de metástases, e uma diferente distribuição topográfica do tumor, quando comparados com ratinhos *knock-out* (Dumont et al., 2003; Olivier et al., 2010).

As mutações do gene *TP53* foram encontradas em homozigotia em ambas as linhas, muito provavelmente por perda de heterozigotia (*LOH, loss of heterozigosity*), associada com deleções do cromossoma 17p, que incluíram o alelo selvagem, e se traduzem em perda da função supressora tumoral do gene *TP53*.

Como já referimos, as mutações somáticas no gene *SMAD4/DPC4* são observadas em cerca de 55% dos adenocarcinomas pancreáticos ductais. A mutação ocorre por deleção homozigótica ou por mutação intragénica associada a perda do alelo selvagem. O gene *SMAD4/DPC4* é importante para a proliferação celular, a motilidade e a apoptose (Blackford et al., 2009).

Nos nossos estudos foram amplificados e sequenciados os 11 exões do gene *SMAD4/DPC4*, mas não se identificaram mutações em nenhuma das linhas celulares.

Uma análise do perfil genético de 22 linhas celulares de adenocarcinoma pancreático revelou deleção homozigótica do gene *DPC4* em 7 (32%) dessas linhas e uma mutação (4,5%) noutra (Moore et al., 2001).

O gene *SMAD4* pertence à família dos genes *SMAD*, que são transdutores dos sinais extracelulares dos ligandos do fator transformador de crescimento β , para o núcleo. O TGF- β regula as funções celulares e tem papel importante na iniciação e na progressão do cancro do pâncreas, assumindo funções duplas de promotor e de inibidor (Xia et al., 2015).

A perda da expressão do gene *SMAD4/DPC4* é geralmente um acontecimento tardio nos tumores invasivos e está associada a metastização extensa e a mau

prognóstico. Esta inativação do gene *DPC4* é habitualmente precedida de alterações nos genes *KRAS*, *CDKN2A* e *TP53* (Blackford et al., 2009).

Quanto à instabilidade de microssatélites, não foi identificada pela análise comparativa dos perfis obtidos com as amostras das nossas linhas celulares e com o controlo normal. A ausência de instabilidade de microssatélites (Fig. 12 e Fig. 13) na bateria de marcadores utilizados, entenda-se BAT 25, BAT 26, NR21, NR22 e NR24, sugere que o sistema de reparação de erros do ADN (*MMR*) se encontra preservado em ambas as linhas celulares, MIA PaCA-2 e PANC-1, apesar de já se encontrar descrita na base de dados *COSMIC* (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*), na linha MIA PaCa-2, e no gene *MLH1*, uma variante *missense* heterozogótica (p.T270I), de efeito biológico desconhecido.

A instabilidade de microssatélites poderá ser fator de prognóstico para a quimioterapia adjuvante (Tejpar et al., 2011). Doentes com tumores do cancro colo-retal, com instabilidade de microssatélites, quando sujeitos a tratamento adjuvante com 5-FU, evidenciaram um prognóstico ligeiramente mais favorável, do que doentes com o mesmo tipo de tumor, mas sem evidência de instabilidade de microssatélites, sujeitos ao mesmo tratamento (Ribic et al., 2003). Todavia, num outro estudo, que compreendeu uma meta-análise englobando 3 690 doentes com cancro colo-retal, foi encontrada MSI-H em 454 doentes e estabilidade de microssatélites (*MSS*, *microsatellite stable*) em 2 871. O estudo demonstrou uma relação estatisticamente significativa entre o estado da estabilidade dos microssatélites (*MSI-H* ou *MSS*) e a resposta à terapêutica com 5-FU, sugerindo menor benefício para os doentes com instabilidade do que para os com estabilidade. Neste estudo o MSI-H para além de se revelar um bom marcador de prognóstico, revelou-se também um fator preditivo negativo (Des Guetz et al., 2009; Guastadisegni et al., 2010).

6.3. Captação dos análogos da somatostatina e recetores da somatostatina

Analise agora os Gráfico 3 e 4, que ilustram os estudos de captação com ^{99m}Tc -TOC, ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1, respetivamente. Em ambos observamos que a percentagem de captação é significativamente superior para a molécula ^{68}Ga -DOTA-NOC comparativamente aos restantes análogos da somatostatina radiomarcados testados.

O ^{99m}Tc -TOC e o ^{68}Ga -DOTA-NOC são usados na imagiologia molecular dos tumores neuroendócrinos enquanto o ^{177}Lu -DOTA-TATE na terapêutica desses tumores (Johnbeck et al., 2014; van der Zwan et al., 2015).

As Tabelas 15 e 16 traduzem, para as linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1, respetivamente, as diferenças de captação com base nas constantes A , que tem unidades de percentagem de captação, e representa a máxima captação teórica dada pelo modelo, e na constante λ , que tem unidades de inverso de tempo (min^{-1}), e está associada à velocidade de rapidez a que se dá a captação.

Constatamos assim que, na linha celular MIA PaCa-2 (Tabela 15), para A , a captação do ^{68}Ga -DOTA-NOC atinge 1,79% a do ^{177}Lu -DOTA-TATE 0,41% e a do ^{99m}Tc -TOC 0,36%, e que para λ , os valores são de $1,11 \text{ min}^{-1}$ para o ^{68}Ga -DOTA-NOC, $0,18 \text{ min}^{-1}$ para o ^{177}Lu -DOTA-TATE e de $0,86 \text{ min}^{-1}$ para o ^{99m}Tc -TOC, o que significa que o ^{68}Ga -DOTA-NOC atinge valores mais altos de percentagem de captação e é captado mais rapidamente. O ^{99m}Tc -TOC embora tenha um valor inferior de A é captado mais rapidamente ($0,86 \text{ min}^{-1}$) do que o ^{177}Lu -DOTA-TATE ($0,18 \text{ min}^{-1}$).

Analisando a Tabela 16, que ilustra os mesmos estudos, mas na linha PANC-1, constatamos que para A , a captação do ^{68}Ga -DOTA-NOC atinge 1,37%, a do ^{177}Lu -DOTA-TATE 0,94% e a do ^{99m}Tc -TOC 0,64%, e que para λ , os valores são de $4,00 \text{ min}^{-1}$ para o ^{68}Ga -DOTA-NOC, $3,64 \text{ min}^{-1}$ para o ^{177}Lu -DOTA-TATE e de $0,40 \text{ min}^{-1}$

para o $^{99m}\text{Tc-TOC}$, o que significa que o $^{68}\text{Ga-DOTA-NOC}$ atinge valores mais altos de percentagem de captação. O $^{99m}\text{Tc-TOC}$ mantém valores de A inferiores. Todavia, nesta linha, o valor de A para o $^{68}\text{Ga-DOTA-NOC}$ é inferior, e o valor λ de $^{177}\text{Lu-DOTA-TATE}$ é bastante superior ao verificado na linha MIA PaCA-2.

Em resumo o $^{68}\text{Ga-DOTA-NOC}$ tem maior captação nas duas linhas e a percentagem de captação do $^{99m}\text{Tc-TOC}$ e do $^{177}\text{Lu-DOTA-TATE}$ aumenta na linha PANC-1. A velocidade de captação do $^{68}\text{Ga-DOTA-NOC}$ e do $^{177}\text{Lu-DOTA-TATE}$ aumenta consideravelmente na linha PANC-1.

Os resultados obtidos com os estudos de captação dos análogos da somatostatina radiomarcados, motivaram-nos para uma pesquisa de todos os recetores da somatostatina em ambas as linhas, estudo cujos resultados estão expressos nos Gráficos 5 (MIA PaCa-2) e 6 (PANC-1). Estes resultados tiveram significado estatístico nas duas linhas, como demonstrado nas Tabelas 17 (MIA PaCA-2) e 18 (PANC-1).

Analisando a distribuição dos diferentes recetores, constatamos que na linha celular MIA PaCa-2 todos os recetores se encontram presentes, predominando os recetores $\text{SSTR3} > \text{SSTR1} > \text{SSTR2b} = \text{SSTR4} > \text{SSTR2a} > \text{SSTR5}$. Na linha celular PANC-1 também todos os recetores estão presentes, predominando $\text{SSTR2a} > \text{SSTR5} > \text{SSTR3} > \text{SSTR4} > \text{SSTR1} > \text{SSTR2b}$.

Os resultados obtidos com a superior captação do $^{68}\text{Ga-DOTA-NOC}$ podem então ser explicados pelo facto de o $^{68}\text{Ga-DOTA-NOC}$ ter uma afinidade para outros recetores para além do SSTR2, enquanto que o $^{177}\text{Lu-DOTA-TATE}$ e o $^{99m}\text{Tc-TOC}$ têm sobretudo afinidade para o SSTR2 (Gabriel et al., 2003; Reubi et al., 2000).

Efetivamente o $^{68}\text{Ga-DOTA-TATE}$ demonstrou ter uma maior afinidade para o recetor SSTR2 dez vezes superior à do $^{68}\text{Ga-DOTA-NOC}$ e à do $^{68}\text{Ga-DOTA-TOC}$ (Reubi et al., 2000). Por sua vez, o $^{68}\text{Ga-DOTA-TATE}$ só se liga ao SSTR2, enquanto o

^{68}Ga -DOTA-NOC e o ^{68}Ga -DOTA-TOC também se ligam ao SSTR5, e o ^{68}Ga -DOTA-NOC tem uma afinidade 10 vezes superior à do ^{68}Ga -DOTA-TOC para se ligar ao SSTR3 (Caplin et al., 2012; Reubi et al., 2000). ^{68}Ga -DOTA-NOC tem assim particular afinidade para os recetores 2, 3 e 5.

A maior captação do ^{177}Lu -DOTA-TATE e do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TOC na linha PANC-1 pode também explicar-se pela maior abundância de recetores de SSTR2, concretamente SSTR2a.

A afinidade para o recetor, o tipo de radiação e o alcance da emissão de positrões são de extrema importância para a eficácia de um radiofármaco, quer em imagiologia, quer em terapia com radionuclídeos. Pequenas modificações nas sequências de aminoácidos, a conjugação com um determinado quelante, e a escolha do isótopo, pode alterar a afinidade para diferentes recetores (Krausz et al., 2011).

A internalização do recetor da somatostatina parece ser apenas passível de ser induzida por agonistas da somatostatina e não por antagonistas (Cescato et al., 2006; Waser et al., 2009). Esta internalização tem sido considerada necessária para o diagnóstico e para a terapêutica com radionuclídeos. Todavia, estudos pré-clínicos têm demonstrado que os antagonistas, ainda não disponíveis na clínica, se ligam a maior número de recetores do que os agonistas, e se dissociam mais lentamente, o que se pode traduzir num sinal de maior intensidade e mais duradouro, sendo que a duração do sinal se encontra associada a um período biológico maior (Ginj et al., 2006; Reubi, 2003). Contudo, após conjugação com o quelante DOTA, têm sido também observadas alterações no comportamento dos radiofármacos, tanto dos antagonistas como dos agonistas (Reubi et al., 2010; Wild et al., 2014).

6.4. Modulação celular com citostáticos

6.4.1. Atividade metabólica

Os Gráficos 7 e 9 apresentam as curvas dose-resposta em função do tempo para as 72 h e as 96 h de incubação, para os citostáticos gemcitabina e 5-FU, na linha celular MIA PaCa-2, respetivamente, e os Gráficos 8 e 10 as curvas dose-resposta em função do tempo, para as 72 h e as 96 h de incubação, para os citostáticos gemcitabina e 5-FU na linha celular PANC-1, respetivamente.

A Tabela 19 mostra o valor de IC50 nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 para as 72 h e as 96 h após incubação com gemcitabina, constatando-se que na linha MIA PaCa-2, às 72 h esse valor (657,31 μM) é superior ao da linha PANC-1 (216,45 μM), mas depois, às 96 h, há uma redução brusca na linha MIA PaCa-2 (0,02 μM), não verificada na linha PANC-1 (483,07 μM), o que pode traduzir uma maior sensibilidade da linha MIA PaCa-2 à gemcitabina. Na linha celular PANC-1 observa-se um fenómeno inverso, com passagem do IC50 às 72 h de 216 μM para 483,07 μM às 92h, o que poderá traduzir aumento da resistência ao fármaco.

A Tabela 20 mostra o valor de IC50 nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 para as 72 h e 96 h, após incubação com 5-FU, observando-se aqui um fenómeno semelhante ao já descrito para a gemcitabina, com valores mais altos de IC50 às 72 h (52,95 μM), na linha MIA PaCa-2 relativamente à linha PANC-1 (17,73 μM). Depois, na linha MIA PaCa-2 o IC50 desce para 10,25 μM às 92 h e na linha PANC-1 desce, mas de forma mais ligeira, para 15,76 μM às 92 h. Aqui, a linha PANC-1, na passagem das 72 para as 96 h, não desenvolve resistência ao fármaco.

Nem a gemcitabina nem o 5-FU conseguiram inibir a atividade metabólica das células de ambas as linhas celulares em estudo após 24 h e 48 h de incubação, para as concentrações testadas.

Os efeitos dos citostáticos são habitualmente mediados pela ativação da apoptose. Estudos efetuados com as linhas celulares pancreáticas AsPC-1, Capan-1, MIA PaCa-2 e T3M4, demonstraram que estas linhas são geralmente mais resistentes ao 5-FU e mais sensíveis à gemcitabina. A relação entre o gene *BAX* (promove apoptose) e o gene *BCL-2* (inibe a apoptose), demonstrou ser preditiva da sensibilidade à quimioterapia, enquanto os níveis de RNAm do *BCL-XL* (previne a libertação do conteúdo mitocondrial, comportando-se como anti-apoptótico) e do *MCL-1* (inibe a apoptose) após exposição repetida ao 5-FU, ou à gemcitabina, demonstrou estarem associadas à resistência a esses fármacos. Já foi demonstrado que a ativação de genes anti-apoptóticos após exposição repetida aos fármacos contribui para a resistência química das linhas celulares pancreáticas, e que o bloqueio dos genes anti-apoptóticos pode aumentar a quimiossensibilidade no cancro do pâncreas (Shi et al., 2002).

A Tabela 21 descreve os valores de IC₅₀ resultantes da incubação das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 com o everolimus, e os Gráficos 11 e 12 mostram as curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h. O valor do IC₅₀ nas duas linhas é muito semelhante, e é dependente do tempo, traduzindo uma sensibilidade progressiva ao fármaco. O everolimus é um inibidor mTOR, uma via serina-treonina-cinase que regula o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celulares, a motilidade, a síntese proteica, a autofagia e a transcrição (Hay and Sonenberg, 2004).

Na Tabela 22 podemos observar que o IC₅₀ determinado após 24 h de incubação com sunitinib é de 0,53 μM para as células MIA PaCa-2, e de 11,66 μM para as células PANC-1. Porém, os valores de IC₅₀ aumentaram para 6,83 μM para as células MIA PaCa-2 e para 15,04 μM para as PANC-1, se considerarmos incubações de 48 h. Todavia, às 72 h e às 96 h o valor de IC₅₀ decresce, respectivamente, para 4,53 μM e para 0,72 μM na linha MIA PaCa-2, mas na linha PANC-1 este perfil não é observado

pois o IC₅₀ após 72 h de incubação é inferior (7,91 µM) do que após 96 h de incubação (14,18 µM).

O sunitinib é um fármaco anti-angiogénico, um inibidor dos recetores da tirosina cinase. A resistência a este fármaco pode ser intrínseca ou adquirida, por mutação secundária no fator de crescimento epidérmico (*EGFR*, *epidermal growth factor receptor*), pode também ser devida à ativação das numerosas vias de sinalização alternativas envolvidas na angiogénese, à produção de fatores de crescimento angiogénico alternativos ou, à sequestração lisosómica pelas células tumorais (Gotink and Verheul, 2010).

A Tabela 23 descreve os valores de IC₅₀ resultantes da incubação das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 com o docetaxel, e os Gráficos 15 e 16 mostram as curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h. A linha MIA PaCa-2 é mais sensível ao fármaco e, pela Tabela 23, constatamos que o IC₅₀ determinado na linha MIA PaCa-2 decresce progressivamente das 24 h (0,1260 µM) para as 72 h (0,0008 µM). Todavia, ocorre um ligeiro aumento no valor de IC₅₀ (0,0016 µM) após 96 h de incubação com este fármaco. Por outro lado, na linha celular PANC-1, verifica-se que a resposta celular obtida é dependente do tempo e que o valor de IC₅₀ varia entre os 0,2350 µM (após 24 h de incubação) e os 0,0350 µM (após 96 h de incubação).

O docetaxel é um membro da família dos taxanos, fármacos que promovem a polimerização da tubulina, e uma estabilização da agregação dos microtúbulos, bloqueando dessa forma a replicação celular na fase G₂/M. Crê-se que o docetaxel inibe o potencial invasivo e migratório das células tumorais, por interferência com o citoesqueleto. A estabilização dos microtúbulos pelos taxanos provoca também a fosforilação e a inativação da BCL-2 (anti-apoptótico) levando a um aumento dos níveis de BAX (pró-apoptótico) e a um conseqüente aumento da apoptose (Shah and Schwartz,

2001). O docetaxel parece ser altamente eficiente na redução da proliferação das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1. A elevação do IC50 às 92 h para a linha MIA PaCa-2 pode dever-se à aquisição de resistência.

Embora as concentrações não possam ser comparadas entre fármacos diferentes, o docetaxel, e depois o sunitinib foram os fármacos cujo IC50, em termos de concentração, teve um valor inferior ao dos restantes. Trata-se, por isso, de fármacos com maior eficácia.

6.4.2. Avaliação da viabilidade e da morte celulares

O Gráfico 17 e o Gráfico 18 apresentam a análise da viabilidade e da morte celulares na linha MIA PaCa-2 e na linha PANC-1, respetivamente.

Através destes gráficos podemos constatar, somando os valores das percentagens parciais das células em apoptose, apoptose/necrose e necrose, que a gemcitabina conseguiu induzir morte celular, sobretudo por apoptose, em 50,2% das células MIA PaCa-2 e 45,7% das células PANC-1, quando comparada com os controlos (14,3% e 12,6%, respetivamente).

Quanto ao 5-FU, este fármaco induziu 47,8% da morte celular nas células MIA PaCa-2, predominantemente por necrose. Na linha PANC-1, o 5-FU consegue induzir 23,2% de morte celular, sobretudo por apoptose/necrose.

Apesar de o everolimus ter um efeito inibitório na atividade metabólica da linha MIA PaCa-2, este fármaco não foi muito eficaz (13,5%) na indução de morte celular nesta linha. Na linha PANC-1 induziu 22,2% de morte essencialmente por apoptose.

De todos os fármacos que utilizámos, o sunitinib é o que induz uma taxa de morte superior em ambas as linhas em estudo. Com efeito, este fármaco induz 83,6% e 87,2% de morte, essencialmente em apoptose/necrose nas células MIA PaCa-2 e PANC-1, respetivamente.

O docetaxel consegue induzir uma elevada taxa de morte celular, 62,4%, na linha MIA PaCa-2, sobretudo por apoptose, e na linha PANC-1 de 27,1%, sem um perfil específico de morte.

O sunitinib e o docetaxel parecem ser mais eficazes na indução de morte na linha MIA PaCa-2 e o sunitinib e a gemcitabina na linha PANC-1. O everolimus é o menos eficaz nas duas linhas. O 5-FU é menos eficaz na linha PANC-1.

O Gráfico 19 demonstra uma análise estatística da viabilidade e da morte celulares na linha MIA PaCa-2.

No que respeita à percentagem de células viáveis, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes fármacos. Com comparações múltiplas corrigidas, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o sunitinib (menor percentagem de células viáveis) e o everolimus (maior percentagem de células viáveis); sem essas comparações, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e as células tratadas com docetaxel ou com sunitinib, e entre as células tratadas com everolimus e as tratadas com sunitinib e com docetaxel.

No que respeita à percentagem de células não viáveis, em apoptose ou em necrose, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes fármacos. Com comparações múltiplas corrigidas, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre controlo (menor percentagem de células não viáveis) e os restantes fármacos, com exceção do everolimus, e entre o everolimus e os restantes fármacos.

O everolimus demonstra assim ser, no que respeita à viabilidade, o fármaco menos eficaz no tratamento desta linha celular, e o sunitinib o mais eficaz.

O Gráfico 20 demonstra uma análise estatística da viabilidade e da morte celulares na linha celular PANC-1.

No que respeita à percentagem de células viáveis, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes fármacos. Com comparações múltiplas corrigidas, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o sunitinib (menor percentagem de células viáveis) e o controlo (maior percentagem de células viáveis); sem essas comparações, demonstraram-se diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ou com sunitinib, e entre o sunitinib e o 5-FU (menor percentagem de células viáveis).

No que respeita à percentagem de células não viáveis, em apoptose ou em necrose, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes fármacos. Com comparações múltiplas corrigidas, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o controlo (menor percentagem de células não viáveis) e a gemcitabina; sem estas comparações corrigidas foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e a gemcitabina, controlo e sunitinib e controlo e docetaxel, e entre o everolimus e os mesmos fármacos.

O everolimus demonstra ser assim, no que respeita à viabilidade, o fármaco menos eficaz no tratamento desta linha, e o sunitinib o mais eficaz.

A Fig. 14 compara a percentagem de células em cada estágio, nas duas linhas, e a Tabela 24 descreve os resultados estatísticos da comparação entre o estágio de morte celular e os fármacos utilizados nas duas linhas celulares.

A Tabela 24 demonstra que para as células viáveis (V) há diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas quando são aplicados os fármacos 5-FU (superior na PANC-1) e everolimus (superior na MIA PaCa-2); para as células em apoptose (A) há diferenças estatisticamente significativas com o everolimus (superior na PANC-1) e o docetaxel (superior na MIA PaCa-2); para as células em apoptose/células em necrose (A/N) há diferenças estatisticamente significativas com o 5-FU (superior na

MIA PaCa-2) e o docetaxel (superior na MIA PaCa-2), e para as células em necrose (N) há diferenças estatisticamente significativas para todos os fármacos (superior na MIA PaCa-2) menos para o sunitinib.

6.4.3. Avaliação do ciclo celular

O ciclo celular foi analisado considerando as diferenças observadas em cada uma das fases do ciclo celular devidas à ação dos fármacos. Os Gráficos 21 e 22 traduzem os resultados obtidos. Na linha MIA PaCa-2 (Gráfico 21), a paragem do ciclo celular dá-se predominantemente na fase G0/G1, para a totalidade dos fármacos. Na linha PANC-1 (Gráfico 22), a paragem do ciclo celular dá-se predominantemente na fase G0/G1, com exceção do 5-FU (fase S) e do docetaxel (fase G2/M).

Os Gráficos 23, 24, 25 e 26 traduzem a análise estatística de cada fase, para a linha MIA PaCa-2. Assim, na linha MIA PaCa-2, verificaram-se, para todas as fases do ciclo celular, diferenças estatisticamente significativas entre os fármacos, mas nenhum dos fármacos se mostrou diferente do controlo. Para a fase pré-G0, a única diferença detetável ocorre entre o docetaxel (maior percentagem de células) e o sunitinib (menor percentagem de células). Na fase G0/G1 a única diferença detetável ocorre entre o 5-FU e o docetaxel. Na fase S, a única diferença detetável ocorre entre as células tratadas com gemcitabina e as tratadas com docetaxel. Na fase G2/M, a única diferença detetável ocorre entre o docetaxel e o sunitinib.

Os Gráficos 27, 28, 29 e 30 traduzem a análise estatística de cada fase, para a linha PANC-1. Assim, na linha PANC-1, para a fase pré-G0, existem diferenças estatisticamente significativas entre os fármacos, mas apenas o 5-FU (maior percentagem de células) apresenta uma diferença significativa com o controlo. Para as fases G0/G1, S e G2/M verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os fármacos, mas nenhum dos fármacos se mostrou diferente do controlo. Na fase G0/G1 a

única diferença detetável ocorre entre o everolimus (maior percentagem de células) e o docetaxel (menor percentagem de células). Na fase S, a única diferença detetável ocorre entre as células tratadas com 5-FU e as tratadas com everolimus. Na fase G2/M, a única diferença detetável ocorre entre o docetaxel e o everolimus. O everolimus é o fármaco que possui menor percentagem de células nas fases S e G2/M.

Na Fig. 15 apresentamos quatro Gráficos que descrevem a percentagem de células em cada fase do ciclo celular, para cada linha, em função dos fármacos utilizados. A Tabela 25 descreve os resultados estatísticos da comparação entre as duas linhas celulares, para cada fármaco, e para cada fase do ciclo celular.

A Tabela 25 demonstra que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas, nas seguintes situações: para a fase Pré-G0 quando são tratadas com gemcitabina (superior na MIA PaCa-2) e docetaxel (superior na MIA PaCa-2); para a fase G0/G1 quando são tratadas com sunitinib (superior na MIA PaCa-2) e com docetaxel (superior na MIA PaCa-2); para a fase S quando são tratadas com o everolimus (superior na PANC-1) e o docetaxel (superior na MIA PaCa-2); para a fase S quando são tratadas com gemcitabina (superior na MIA PaCa-2), everolimus (superior na MIA PaCa-2) e sunitinib (superior na PANC-1), e para a fase G2/M quando são tratadas com sunitinib (superior na PANC-1) e com docetaxel (superior na PANC-1). Na linha PANC-1 constatamos que o facto de a maioria dos fármacos induzir paragem do ciclo celular em G0/G1, com exceção do 5-FU, fase S, e do docetaxel, fase G2/M, levanta a hipótese de uma terapia combinada com os três fármacos poder trazer vantagem na eliminação das células tumorais (Shah and Schwartz, 2001).

A paragem do ciclo celular na fase G0/G1, observada nas linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, pode modular o limiar de ativação da apoptose. O ciclo celular é o mecanismo pelo qual as células se dividem, e é conduzido pelas proteínas CDK, que são reguladas

positivamente pelas ciclinas (A, B, D e E), e negativamente reguladas pelos inibidores das CDKs, os CDKI (*cyclin-dependent kinase inhibitor*). O padrão de expressão das ciclinas varia com o padrão de progressão das células através do ciclo celular. Até hoje cerca de nove CDK foram identificadas, embora nem todas tenham papel regulador. Os complexos CDK/ciclinas são ativados pela fosforilação pela CDK7. A apoptose é um processo ativo, em que a célula participa na sua própria destruição. A cascata molecular da apoptose é caracterizada pela libertação precoce do citocromo c pela mitocôndria, activação do fator 1 ativador da protease apoptótica (APAF-1, *apoptotic protease activating factor 1*), activação da caspase 9, e clivagem em cascata de várias outras caspases. No decorrer do processo apoptótico, estas caspases eliminam um conjunto de proteínas celulares como a PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase*), laminina e β -actina, que são marcadores de morte celular (Elmore, 2007). A falência de muitos citostáticos reside na sua incapacidade para induzir apoptose. As células neoplásicas são capazes de adquirir um conjunto de mutações e adaptações celulares que previnem a apoptose. O gene *TP53*, por exemplo, tem um papel importante na regulação do ciclo celular e, no nosso caso, ambas as linhas apresentam mutações neste gene. Células tumorais com mutação no *TP53* demonstraram também maior resistência à apoptose na presença de citostáticos (Soussi, 2003).

6.5. Análise dos recetores da somatostatina após ação quimiossensibilizante dos citostáticos

A análise da expressão dos recetores da somatostatina face aos resultados obtidos nos estudos de captação do ^{99m}Tc -TOC, ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE, conduziu-nos também à análise da expressão desses recetores nas linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, após submissão aos citostáticos gemcitabina, 5-FU, gemcitabina, everolimus, sunitinib e docetaxel. Os resultados encontram-se descritos nas Figs. 26 e 27.

Na linha MIA PaCa-2 (Fig. 26), observa-se um aumento da expressão de todos os recetores de somatostatina, com exceção dos recetores SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3 e SSTR4, com o citostático docetaxel.

Para todos os recetores foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fármacos (Tabela 29), mas entre o controlo e os recetores, só foram encontradas (Tabela 29) diferenças estatisticamente significativas para o SSTR2a, entre o controlo e as células tratadas com o 5-FU, e para o SSTR5, entre o controlo e as células tratadas com 5-FU (Tabela 29).

Na linha PANC-1 (Fig. 27), observa-se um aumento da expressão de todos os recetores de somatostatina, com exceção dos recetores SSTR2a, SSTR4 e SSTR5, com o citostático everolimus.

Para todos os recetores foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os fármacos (Tabela 30). Todavia, entre o controlo e os fármacos (Tabela 30) só foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para alguns recetores. Por exemplo, para o SSTR1, entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ou tratadas com docetaxel; para o SSTR2a, entre o controlo e as células tratadas com docetaxel; para o SSTR2b, entre o controlo e as células tratadas com gemcitabina ou tratadas com sunitinib; para o SSTR3, entre o controlo e as células tratadas com everolimus ou tratadas com o docetaxel; e para o SSTR5, entre o controlo e as células tratadas com docetaxel (Tabela 30).

Em resumo, podemos dizer que, em ambas as linhas há, de uma forma geral, aumento da expressão dos recetores após incubação com os citostáticos. Este aumento é estatisticamente significativo para os recetores SSTR2a e SSTR5 na linha MIA Paca-2 induzida pelo 5-FU, e estatisticamente significativo na linha PANC-1, para os recetores SSTR1 e SSTR2b induzida pela gemcitabina, para o SSTR2b induzida pelo sunitinib,

para o SSTR3 induzida pelo everolimus, e para os recetores SSTR1, SSTR2a, SSTR3 e SSTR4 induzida pelo docetaxel.

O 5-FU foi o único citostático que induziu expressão estatisticamente significativa dos recetores na linha MIA PaCA-2, e na linha PANC-1 todos os citostáticos, particularmente o docetaxel, e com exceção apenas do 5-FU, induziram alterações com expressão significativa dos recetores.

A Fig. 28 mostra a expressão dos diferentes recetores da somatostatina nas duas linhas celulares após incubação com os fármacos, e a Tabela 31 compara estatisticamente a expressão de todos os recetores, entre as duas linhas, com os diferentes citostáticos, demonstrando que para o SSTR1 há diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas quando são tratadas com gemcitabina (superior na PANC-1), com sunitinib (superior na PANC-1) e com docetaxel (superior na PANC-1); para o SSTR2a há diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas quando são tratadas com gemcitabina (superior na PANC-1), com everolimus (superior na MIA PaCa-2), com sunitinib (superior na PANC-1) e com docetaxel (superior na PANC-1); para o SSTR2b há diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas quando são tratadas com gemcitabina (superior na PANC-1), com everolimus (superior na MIA PaCa-2), com sunitinib (superior na PANC-1) e com docetaxel (superior na PANC-1); para o SSTR3 há diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas quando são tratadas com gemcitabina (superior na PANC-1), com 5-FU (superior na PANC-1), com everolimus (superior na PANC-1), com sunitinib (superior na PANC-1) e com docetaxel (superior na PANC-1); para o SSTR4 há diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas quando são tratadas com gemcitabina (superior na PANC-1), com everolimus (superior na MIA PaCa-2), com sunitinib (superior na PANC-1) e com docetaxel (superior na PANC-1) e para o SSTR5 há diferenças

estatisticamente significativas entre as duas linhas quando são tratadas com gemcitabina (superior na PANC-1), com everolimus (superior na MIA PaCa-2), com sunitinib (superior na PANC-1) e com docetaxel (superior na PANC-1).

Em resumo podemos dizer que o aumento dos recetores foi mais pronunciado na linha PANC-1, relativamente à linha MIA PaCa-2.

Vários estudos têm sido publicados demonstrando a influência de hormonas e de fatores de crescimento no aumento da expressão de recetores nas células tumorais (Forssell-Aronsson et al., 2013). Está descrito, por exemplo, o aumento da expressão dos recetores de peptídeos após irradiação (Oddstig et al., 2006) e também doses baixas de [$^{177}\text{Lu-DOTA}^0, \text{Tyr}^3$]octreotato induziram aumento dos recetores SSTR2 em ratos xenotransplantados com a linha tumoral pancreática CA20948 (Capello et al., 2005; Melis et al., 2007). Também o pré-tratamento com gemcitabina induziu o aumento da captação do [$^{177}\text{Lu-DOTA}^0, \text{Tyr}^3$]octreótido (Nayak et al., 2008). Neste estudo, os autores defendem que o citostático mimetiza as mesmas lesões do ADN induzidas pela radiação e que por isso pode também induzir as mesmas vias de reparação. Hipoteticamente, esse mecanismo de reparação desempenharia um papel importante no aumento da expressão dos recetores de somatostatina, e o aumento da captação do radiofármaco poderia resultar de um aumento da endocitose dos ligandos do SSTR.

6.6. Estudos de captação após modulação celular com citostáticos

Quando procedemos à incubação das células da linha celular MIA PaCA-2 com as concentrações correspondentes ao IC50 das 24 horas de todos os fármacos testados nesta investigação, e procedemos posteriormente a estudos de captação com 25 μCi de $^{177}\text{Lu-DOTA-TATE}$, constatámos (Gráfico 36 e Tabela 32) um aumento da captação relativamente ao controlo com todos os citostáticos, com exceção do 5-FU.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o 5-FU atua como radiosensibilizante. Crê-se que para essa ação sensibilizante seja necessário que as células tumorais progridam para a fase S do ciclo celular, na presença do fármaco (Lawrence et al., 2003), mas como podemos constatar pela análise do Gráfico 21, as células MIA PaCa-2 quando incubadas com o 5-FU encontram-se predominantemente na fase G0/G1.

Na linha PANC-1 (Gráfico 37 e Tabela 33) só ocorre aumento da captação com o sunitinib, exatamente um dos citostáticos que induziu um maior aumento da expressão dos recetores. Todavia, seria de esperar um aumento da captação de outros fármacos como o everolimus e sobretudo do docetaxel, o que não sucedeu.

Estão descritos, como já tivemos oportunidade de referir na introdução, os resultados de um estudo de fase II, envolvendo 106 doentes com adenocarcinoma ductal pancreático localizado avançado (com início de invasão das estruturas ou órgãos vizinhos), irressecável ou metastizado, que compara dois grupos, um com o tratamento convencional com gemcitabina e outro com a associação de gemcitabina com sunitinib, devido ao seu potencial anti-angiogénico, mas esta associação não se revelou superior à convencional (Bergmann et al., 2015). Um outro estudo de fase II, envolvendo 77 pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático metastizado, tratados com sunitinib, após não terem melhorado com o tratamento inicial com gemcitabina, também não teve resultados encorajadores (O'Reilly et al., 2010). Todavia, os resultados que obtivemos com o sunitinib, nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1, quer na captação do ^{177}Lu -DOTA-TATE após modulação celular, quer na incubação das linhas celulares com o fármaco, revelam-se promissores.

O aumento da captação do ^{177}Lu -DOTA-TATE poderia ser explicado pelo aumento dos recetores SSTR2 nas duas linhas celulares, dada a elevada afinidade deste radiofármaco por este recetor. Todavia, esse raciocínio não explica o aumento da

captação apenas para o sunitinib na linha celular PANC-1, o que nos leva a admitir que outros fatores, para além dos recetores, influenciam a captação.

Efetivamente, este resultado contradiz os resultados obtidos nos estudos de captação efetuados nas linhas, onde verificámos (Tabelas 15 e 16) que na linha celular PANC-1 o ^{177}Lu -DOTA-TATE tem um valor de A (0,94%), cerca de 2,3 vezes superior ao constatado na linha celular MIA PaCA-2 (0,41%).

Na linha PANC-1, parece que a incubação com todos os citostáticos, à exceção do sunitinib, levou a uma dessensibilização das células para o radiofármaco. Isto poderia ser explicado por uma resistência da linha PANC-1 aos citostáticos, que conduziu à redução da captação do ^{177}Lu -DOTA-TATE. A presença, nesta linha celular, da glicoproteína P, o produto do gene da multirresistência aos fármacos (*MDR1*, *multi-drug resistance gene*) poderia explicar este efeito. No pâncreas, a glicoproteína P foi descoberta na porção apical das células epiteliais dos ductos pancreáticos (Thiebaut et al., 1987). A glicoproteína P é uma proteína dependente de ATP, responsável pelo efluxo dos fármacos, visando manter as suas concentrações intracelulares abaixo dos níveis citotóxicos (Lin and Yamazaki, 2003). Em estudos realizados com células do cancro do pulmão de não pequenas células, conclui-se que a sobreexpressão do gene *MDR1* podia prever a ineficácia da quimiorradioterapia com o paclitaxel (Maraz et al., 2011; Melguizo et al., 2012). É assim possível que as células PANC-1 tenham uma elevada expressão da glicoproteína P, aspeto a explorar no futuro. No caso do sunitinib pode acontecer que o fármaco consiga inibir a ação da glicoproteína P. No cancro da mama, a proteína ABCG2 parece ter influência na capacidade de resistência a este tipo de fármaco (Abdallah et al., 2015; Tang et al., 2012).

Poderíamos também admitir que o aumento dos recetores na linha PANC-1 pode não se traduzir por um aumento da sua funcionalidade.

Efetivamente foi demonstrado que o gene codificador do recetor SSTR2 se encontrava presente nas linhas celulares de adenocarcinoma pancreático Capan-1, Capan-2, CAV, MIA PaCa-2 e PANC-1. Todavia, com exceção das células MIA PaCA-2, o recetor não se exprimia a nível membranar, pelo que só nesta linha é que se verificava alguma redução tumoral sob a ação da somatostatina (Fisher et al., 1998; Reubi et al., 2000).

Numa tentativa de ultrapassar a escassez de recetores da somatostatina nos adenocarcinomas pancreáticos, alguns investigadores tentaram *in vitro*, e com sucesso, a transferência génica do gene codificador da somatostatina, conseguindo dessa forma aumentar os recetores membranares desta hormona e controlar assim o crescimento tumoral (Fisher et al., 2002). Todavia, não nos parece que seja este o caso, já que com o ^{68}Ga -DOTA-NOC houve captação, e mais marcada na linha PANC-1, o que nos faz admitir que tanto na linha celular MIA PACA-2 como na linha celular PANC-1 existem recetores funcionais. Neste sentido, seria interessante futuramente efetuar estudos de captação comparativos com o ^{68}Ga -DOTA-NOC, após modulação celular com citostáticos, para verificarmos se o seu comportamento seria idêntico ao do ^{177}Lu -DOTA-TATE.

Dados recentes demonstram também que a expressão conjunta de diferentes subtipos de recetores de somatostatina afeta a sua farmacocinética e propriedades funcionais, o que sucede particularmente nos tumores neuroendócrinos, que habitualmente expressam diferentes níveis de SSTRs. A via transdutora de sinal do recetor é significativamente alterada pela sua homo- e/ou heterodimerização, e cada SSTR exprime um padrão específico de dimerização, que é regulada pelo seu ligando

(Chalabi et al., 2014). A dimerização afeta a ligação do ligando ao recetor, a expressão do recetor, e a transdução de sinal. A coexpressão do SSTR2 e do SSTR5, por exemplo, demonstrou reduzir a internalização e a dessensibilização (Sharif et al., 2007). Também o SSTR5 pode facilitar a reciclagem do SSTR2, afetando dessa forma a resposta a longo prazo à terapia tumoral com octreótido (Duran-Prado et al., 2012; Duran-Prado et al., 2010; Ruscica et al., 2013). Em tumores da hipófise foi descoberta uma variante do SSTR5, capaz de heterodimerizar com o SSTR2, reduzindo o seu acesso à membrana plasmática e diminuindo a resposta destes tumores ao tratamento com análogos da somatostatina (Duran-Prado et al., 2012; Duran-Prado et al., 2010). Uma melhor caracterização dos homodímeros e heterodímeros dos SSTR pode resultar numa melhor compreensão das relações entre a biologia molecular, a especificidade do receptor, e a eficácia terapêutica dos diferentes análogos da somatostatina (Duran-Prado et al., 2008). A expressão elevada dos recetores da somatostatina nas células tumorais pode também facilitar a homo- e a heterodimerização dos recetores constituindo conformações específicas que tornam as células insensíveis a um análogo específico da somatostatina (Ben-Shlomo et al., 2010).

Constatamos também, pelos nossos resultados, que há fármacos que induzem um aumento pronunciado de recetores, como por exemplo o everolimus e o docetaxel na linha celular PANC-1, sem que isso se traduza por um aumento da captação do radiofármaco após incubação com esses citostáticos, o que nos leva a pensar que poderíamos, também num estudo futuro, tentar associar dois grupos de fármacos, uns que induzissem aumento da expressão dos recetores, e outros com que se verificasse uma maior captação do radiofármaco.

7. Conclusões

O adenocarcinoma ductal pancreático constitui a quarta causa de morte por cancro na Europa e nos Estados Unidos da América. É um tumor insidioso, sem quadro clínico específico, e de diagnóstico tardio, com uma sobrevida aos 5 anos de cerca de 7%. Estamos perante um tumor altamente agressivo, resistente à quimioterapia e à radioterapia e que, quando ressecável, apresenta uma taxa de recidiva de cerca de 80%.

A pesquisa de novas formas de tratamento é assim um objetivo a prosseguir, pelo que neste projeto propusemo-nos investigar se a associação da quimioterapia à terapia com radionuclídeos dirigida a recetores de peptídeos poderia traduzir-se num sinergismo importante.

Os nossos estudos realizaram-se em duas linhas celulares de adenocarcinoma pancreático ductal, a MIA PaCa-2 e a PANC-1 e em xenotransplantes heterotópicos obtidos com estas linhas celulares.

A linha celular MIA PaCA-2 evidenciou a presença de dois tipos morfológicos de células, a variante de células grandes e a variante de células pequenas, agrupadas em mórula, e a linha PANC-1 três tipos morfológicos de células, a variante de células grandes e isoladas, a variante de células de dimensão intermédias e estreladas, e a variante de células pequenas. Este padrão manteve-se após tratamento com citostáticos, e nos xenotransplantes. Contudo, a inexistência de marcadores específicos de células pancreáticas tumorais, não nos permite afirmar que estamos perante um caso de polimorfismo, para a linha celular MIA PaCa-2, ou de pleomorfismo para a linha celular PANC-1.

A linha celular MIA PaCA-2 e a linha celular PANC-1 são linhas de adenocarcinoma ductal pancreático, com diferenciação neuroendócrina e recetores de somatostatina.

Após modulação celular com os citostáticos, a linha celular MIA PaCa-2 deixou de expressar E-caderina, o que lhe confere um fenótipo mais agressivo. Também nesta linha se observou o aparecimento de um terceiro grupo de células, fusiformes, que cremos tratar-se de células grandes ou pequenas modificadas por ação dos citostáticos, já que apresentaram marcação. A linha celular PANC-1, após modulação celular com os citostáticos, passou a expressar sinaptofisina, o que lhe confere um fenótipo mais endócrino. Ainda após modulação celular com os citostáticos gemcitabina e docetaxel, as células pequenas deixaram de se observar nas duas linhas celulares, o que cremos se terá devido à sua morte provocada por estes citostáticos.

Nos estudo *in vivo*, nos xenotransplantes, a expressão dos marcadores e dos recetores analisados sofreu variações, comparativamente às linhas celulares, com diminuição ou aumento da expressão de marcadores e de recetores.

Os resultados do perfil imunohistoquímico obtidos nas linhas celulares após modulação com citostáticos, e nos xenotransplantes, devem ser analisados com precaução, já que o número de amostras estudado foi reduzido.

Ambas as linhas celulares exprimem um fenótipo epitelial-mesenquimal, que se mantém após tratamento com os citostáticos, e nos xenotransplantes. No cancro do pâncreas, o fenótipo EMT contribui para a resistência à quimioterapia. Os nossos resultados indicam que ambas as linhas celulares possuem potencial EMT mas, este potencial, por ausência da E-caderina, é superior na linha PANC-1.

As linhas celulares em estudo apresentaram marcadores de células estaminais, com heterogeneidade populacional. A linha celular MIA PaCA-1 evidenciou um

fenótipo CD24⁻CD44^{+/++}CD326^{-/+} e CD133/1⁻ e a linha PANC-1 um fenótipo CD24⁻CD44⁺CD326^{-/+} e CD133/1⁻. A ausência de expressão do CD133 reduz a capacidade das linhas para metastizarem. Todavia, a presença de células estaminais não pode ser inferida apenas com base na expressão dos marcadores selecionados. Estudos funcionais de confirmação, como ensaios de formação de esferas, ou de tumorigênese em ratinhos imunocomprometidos, seriam necessários.

A linha celular MIA PaCa-2 apresentou uma mutação *missense*, sem heterozigotia, no codão 12 do *KRAS*, p.G12C, com substituição do aminoácido glicina pelo aminoácido cisteína, devido à transversão de uma guanina (G) por uma timina (T), GGT>TGT. A linha celular PANC-1 também apresentou uma mutação *missense* no codão 12, com substituição da glicina pelo ácido aspártico, em heterozigotia, devido à transição de uma guanina por uma adenina (A) (p.G12D; GGT>GAT). A amplificação dos exões 1-3 do gene *CDKN2A/p16^{INK4A}* identificou a existência de uma deleção em homozigotia, incluindo os três exões, em ambas as linhas celulares. As células da linha celular MIA PaCa-2 apresentaram uma mutação *missense* sem heterozigotia, no exão 7 do *TP53*, com substituição da arginina na posição 248 por triptofano (p.R248W), devido à transição de uma citosina (C) por uma timina (T) (CGG>TGG). As células da linha celular PANC-1 revelaram duas variações *missense* em dois exões distintos do *TP53*, uma no exão 4, que corresponde a um polimorfismo comum, com substituição da prolina na posição 72 por arginina (p.P72R) devido à transversão de uma citosina por uma guanina (CCC>CGC), e outra no exão 8, com substituição da arginina na posição 273 por uma histidina (p.R273H), por transição de uma guanina por uma adenina (CGT>CAT). Não se observaram nas linhas celulares mutações no gene *SMAD4/DPC4* nem instabilidade de microssatélites.

As mutações no gene *KRAS* provocam desregulação das vias *MAPK/ERK* e *PI3K/PTEN/Akt/mTORC1/GSK-3*, e conferem resistência aos fármacos e à apoptose, e promovem o crescimento tumoral e metastização agressivos, sendo de mau prognóstico. O gene *CDKN2A/p16^{INK4A}* é um importante regulador negativo do ciclo celular, atuando essencialmente nas fases G1/S e G2/M. A mutação no exão 4 do *TP53*, traduz-se em diferenças na indução da apoptose. As duas variantes patogénicas, nos exões 7 e 8, correspondem ao domínio de ligação ao ADN do gene *TP53*, e sabe-se que alteram a sua função como ativador da transcrição.

Ambas as linhas celulares expressaram todos os recetores da somatostatina, com o SSTR3, SSTR1 e SSTR2b predominando na linha MIA PACa-2, e o SSTR2a e SSTR5 predominando na linha PANC-1.

Os estudos de captação com ^{99m}Tc-TOC, com ⁶⁸Ga-DOTA-NOC e com ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE evidenciaram uma superior captação do ⁶⁸Ga-DOTA-NOC em ambas as linhas celulares, facto que atribuímos à maior afinidade do ⁶⁸Ga-DOTA-NOC para os recetores SSTR2, SSTR3 e SSTR5.

Os estudos de quimioterapia, demonstraram que todos os citostáticos conseguiram inibir a atividade metabólica das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1, com o docetaxel, e depois o sunitinib, revelando maior eficácia. Nem a gemcitabina nem o 5-FU conseguiram inibir a atividade metabólica de ambas as linhas celulares em estudo após 24 h e 48 h de incubação, para as concentrações testadas, facto que atribuímos à resistência das linhas aos dois fármacos, em particular ao 5-FU. Os estudos de viabilidade e morte evidenciaram que o sunitinib e o docetaxel foram os mais eficazes na indução de morte na linha MIA PaCa-2, e o sunitinib e a gemcitabina na linha PANC-1. O 5-FU foi menos eficaz na linha PANC-1, e o everolimus foi o menos eficaz nas duas linhas. A morte celular decorreu essencialmente por apoptose, com exceção do

sunitinib, em que decorreu por apoptose e por necrose. Os estudos de ciclo celular mostraram que, nas duas linhas, a paragem do ciclo celular se deu essencialmente na fase G0/G1, com exceção do 5-FU, fase S, e do docetaxel, fase G2/M, na linha PANC-1. A paragem do ciclo celular na fase G0/G1, observada nas linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, modula o limiar de ativação da apoptose.

Após modulação celular com os citostáticos, ocorreu em ambas as linhas, de uma forma geral, aumento da expressão dos receptores estudados. Este aumento foi mais pronunciado na linha celular PANC-1, e foi estatisticamente significativo para os recetores SSTR2a e SSTR5 na linha celular MIA Paca-2 induzida pelo 5-FU, e estatisticamente significativo na linha celular PANC-1, para os recetores SSTR1 e SSTR2b induzida pela gemcitabina, para o SSTR2b induzida pelo sunitinib, para o SSTR3 induzida pelo everolimus, e para os recetores SSTR1, SSTR2a, SSTR3 e SSTR4 induzida pelo docetaxel.

Os estudos de captação do ^{177}Lu -DOTA-TATE após modulação celular com o IC50 dos citostáticos às 24 h, demonstrou, na linha celular MIA PaCa-2 um aumento da captação relativamente ao controlo com todos os citostáticos, com exceção do 5-FU. Na linha celular PANC-1 só ocorreu aumento da captação com o sunitinib. Aparentemente, na linha celular PANC-1, a incubação com todos os citostáticos, à exceção do sunitinib, levou a uma dessensibilização das células para o radiofármaco. Isto poderia ser explicado por uma resistência da linha PANC-1 aos citostáticos, conduzida, por exemplo, por mecanismos moleculares responsáveis pelo efluxo dos fármacos, visando manter as suas concentrações intracelulares abaixo dos níveis citotóxicos.

Os resultados *in vitro* da nossa investigação apoiam a hipótese de que a associação da quimioterapia, particularmente do sunitinib, à radioterapia metabólica dirigida a recetores de peptídeos, particularmente com o ^{177}Lu -DOTA-TATE, tem efeito

sinérgico, e pode representar uma opção na terapêutica do adenocarcinoma ductal pancreático.

8. Perspetivas futuras

Porque um projeto de investigação é sempre um ponto de partida para novas investigações, a continuação do nosso projeto poderia passar pelos seguintes objetivos:

1. Estudar, retrospectiva e prospectivamente, em lâminas e em peças operatórias de adenocarcinomas ductais pancreáticos, localizados e/ou metastizados, o perfil imunohistoquímico dos marcadores CK5.6, AE1/AE3, E-caderina, vimentina, cromogranina A, sinaptofisina e SSTR2;
2. Realizar estudos de modulação celular com associação de fármacos;
3. Pesquisar indutores da sobreexpressão dos recetores da somatostatina;
4. Pesquisar novas associações da quimioterapia com a terapia com moléculas marcadas com radionuclídeos dirigida a recetores de peptídios;
5. Realizar ensaios *in vivo* com xenotransplantes.

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Síndromes genéticas e fatores de risco associados com o adenocarcinoma pancreático	5
Tabela 2 - Classificação histológica dos tumores do pâncreas exócrino (OMS, 2010)	7
Tabela 3 - Classificação histológica das lesões precursoras do adenocarcinoma ductal pancreático	8
Tabela 4 - Estadiamento TMN para o adenocarcinoma ductal pancreático (AJCC)	11
Tabela 5 - Classificação TNM dos tumores do pâncreas exócrino (OMS, 2004).....	12
Tabela 6 - Classificação histológica dos tumores do pâncreas endócrino (OMS, 2004)	26
Tabela 7 - Funções dos recetores da somatostatina	31
Tabela 8 - Estrutura dos análogos sintéticos da somatostatina	33
Tabela 9 - Marcadores imunohistoquímicos e controlos utilizados nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1.....	45
Tabela 10 - Sequências de <i>primers</i> e temperaturas de <i>annealing</i> utilizados na amplificação dos genes <i>KRAS</i> , <i>CDKN2A/p16^{INK4A}</i> , <i>TP53</i> , <i>SMAD4/DPC4</i>	56
Tabela 11 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados na deteção de instabilidade de microssatélites	59
Tabela 12 - IC50 às 72 h dos citostáticos utilizados nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1	67
Tabela 13 - Imunofenotipagem da linha celular MIA PaCa-2	73
Tabela 14 - Imunofenotipagem da linha celular PANC-1.....	75
Tabela 15 - Valores e intervalos de confiança das constantes A e λ nos estudos de captação da linha MIA PaCa-2.....	90
Tabela 16 - Valores e intervalos de confiança das constantes A e λ nos estudos de captação da linha PANC-1	91
Tabela 17 - Valores de p para a distribuição dos recetores da somatostatina na linha MIA PaCa-2	92
Tabela 18 - Valores de p para a distribuição dos recetores da somatostatina na linha PANC-1	93
Tabela 19 - IC50 das células MIA PaCa-2 e PANC-1 após incubação com gemcitabina	94
Tabela 20 - IC50 das células MIA PaCa-2 e PANC-1 após incubação com 5-FU.....	96
Tabela 21 - IC50 das células MIA PaCa-2 e PANC-1 após incubação com everolimus	97

Tabela 22 -IC50 das células MIA PACa-2 e PANC-1 após incubação com sunitinib	99
Tabela 23 -IC50 das células MIA PACa-2 e PANC-1 após incubação com docetaxel.....	101
Tabela 24 -Comparação estatística entre o estágio de morte celular e os fármacos utilizados nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1	109
Tabela 25 -Comparação estatística entre a fase do ciclo celular e o fármaco utilizado nas linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1	121
Tabela 26 -Imunofenotipagem das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1 após 72h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 dos diferentes fármacos	122
Tabela 27 -Imunofenotipagem da linha celular MIA PaCa-2 sem e após 72h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 dos diferentes fármacos	123
Tabela 28 -Imunofenotipagem da linha celular PANC-1 sem e após 72h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 dos diferentes fármacos	128
Tabela 29 -Comparação estatística da expressão dos recetores de somatostatina na linha MIA PaCa-2 após modulação celular com citostáticos	135
Tabela 30 -Comparação estatística da expressão dos recetores de somatostatina na linha PANC-1 após modulação celular com citostáticos.....	136
Tabela 31 -Comparação estatística entre a expressão dos recetores de somatostatina nas linhas celulares MIA Paca-2 e PANC-1 após incubação com os fármacos	139
Tabela 32 -Valores e intervalos de confiança das constantes A e λ nos estudos de captação da linha MIA PaCa-2, após incubação com o IC50 das 24h dos citostáticos	141
Tabela 33 -Valores e intervalos de confiança das constantes A e λ nos estudos de captação da linha PANC-1, após incubação com o IC50 das 24h dos citostáticos	142
Tabela 34 -Imunofenotipagem dos xenotransplantes de MIA PaCa-2 e PANC-1	143
Tabela 35 -Mediana dos resultados de imunofenotipagem das células grandes nos xenotransplantes de MIA PaCa-2 e na linha celular correspondente.....	145
Tabela 36 -Mediana dos resultados de imunofenotipagem das células pequenas nos xenotransplantes de MIA PaCa-2 e na linha celular correspondente.....	146
Tabela 37 -Mediana dos resultados de imunofenotipagem das células grandes nos xenotransplantes de PANC-1 e na linha celular correspondente	146
Tabela 38 -Mediana dos resultados de imunofenotipagem das células pequenas nos xenotransplantes de PANC-1 e na linha celular correspondente	147

Índice de Figuras

- Figura 1 - Câmara de Neubauer (A) e ampliação da grelha de contagem (B).....53
- Figura 2 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica. A: CK 5.6 x200; B: AE1/AE3 x200; C: E-Caderina x400; D: Vimentina x400; E: Cromogranina A x400; F: Sinaptofisina x400; G: SSTR2 x400; H: NTR1 x400.74
- Figura 3 - PANC-1: Imunohistoquímica. A: CK 5.6 x400; B: MNF 116 x200; C: Vimentina x200; D: Cromogranina A x400; E: CD56 x400; F: SSTR2 x400.76
- Figura 4 - Representação gráfica da análise por citometria de fluxo da morfologia e da expressão dos marcadores de células estaminais nas células tumorais de MIA PaCa-2. A: Dot Plot FSC/SSC representativo das populações P1 (vermelho), P2 (verde) e P3 (azul) ; B: Histograma representativo da expressão de 7AAD nas 3 subpopulações P1, P2 e P3; C: Histograma representativo da expressão de CD24⁻ nas 3 subpopulações P1, P2 e P3; D: Histograma representativo da expressão de CD44^{+/++} nas 3 subpopulações P1, P2 e P3; E: Histograma representativo da expressão de CD133/1⁻ nas 3 subpopulações P1, P2 e P3; F: Histograma representativo da expressão de CD326⁻ na subpopulação P3 (azul); G: Histograma representativo da expressão de CD326⁺ na subpopulação P2 (verde); H: Histograma representativo da expressão de CD44 nas subpopulações de células grandes (azul) (CD44⁺⁺) e pequenas (verde) (CD44⁺); I: Expressão CD44/CD326.....80
- Figura 5 - Representação gráfica da análise por citometria de fluxo da morfologia e da expressão dos marcadores de células estaminais nas células tumorais de PANC-1. A: Dot Plot FSC/SSC representativo das população P1 (azul); B: Representação gráfica da expressão de CD24⁺ na população P1; C: Representação gráfica da expressão de CD133/1⁻ na população P1; D: Representação gráfica da expressão de CD326⁺ na população P1; E: Representação gráfica da expressão de CD44⁺ na população P1.82
- Figura 6 - Eletroferograma de sequenciação correspondente ao codão 12 e 13 do gene *KRAS* na linha celular MIA PaCa-2. A seta assinala o ponto de homozigotia da mutação do codão 12.83
- Figura 7 - Eletroferograma de sequenciação correspondente ao codão 12 e 13 do gene *KRAS* na linha celular PANC-1. A seta assinala o ponto de heterozigotia da mutação do codão 12.84
- Figura 8 - Resultado da eletroforese dos produtos de amplificação dos exões 1, 2 e 3 do gene *CDKN2A/p16^{INK4A}*, para a linha celular MIA PaCa-2. A letra B corresponde aos controlos de contaminação, sem ADN (branco), a letra C corresponde a amostras normais, utilizadas como controlos positivos, a letra A corresponde às amostras da linha celular e os algarismos correspondem ao número do exão amplificado, de 1 a 3. MPM - marcador de peso molecular ϕ X174 DNA-HaeIII..85

- Figura 9 - Eletroferograma de sequenciação do exão 7 do gene *TP53* correspondente à linha celular MIA PaCa-2. A seta representa o local de mutação.86
- Figura 10 - Eletroferograma de sequenciação do exão 4 do gene *TP53* correspondente à linha celular PANC-1. A seta representa o local de substituição, verificando-se não existir heterozigotia.87
- Figura 11 - Eletroferograma de sequenciação do exão 8 do gene *TP53* correspondente à linha celular PANC-1. A seta representa o local de substituição, verificando-se não existir heterozigotia.87
- Figura 12 - Comparação entre os resultados da análise de fragmentos para os cinco microssatélites utilizados na amostra controlo e na amostra tumoral da linha celular MIA PaCa-2.....88
- Figura 13 - Comparação entre os resultados da análise de fragmentos para os cinco microssatélites utilizados na amostra controlo e na amostra tumoral da linha celular PANC-1.89
- Figura 14 - Comparação da percentagem de células em cada estágio (V – células viáveis; A – células em apoptose; A/N – células em apoptose/células em necrose; N – células em necrose) entre as linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, em função do controlo e dos fármacos gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel.109
- Figura 15 - Comparação da percentagem de células em cada fase do ciclo celular (pré-G0, G0/G1, S e G2/M) entre as linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, em função do controlo e dos fármacos gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel.....120
- Figura 16 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com sunitinib. A: CK5.6 x200; B: AE1/AE3 x400; C: Vimentina x200; D: CD56 x400; E: Sinaptofisina x400; F: SSTR2 x200. Barra de escala: 10 µm.125
- Figura 17 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com gemcitabina. A: CK5.6 x200; B: AE1/AE3 x200; C: Vimentina x200; D: Cromogranina A x200; E: CD56 x200; F: Sinaptofisina x200; G: SSTR2 x200. Barra de escala: 10 µm.125
- Figura 18 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com 5-FU. A: CK5.6 x200; B: AE1/AE3 x200; C: Vimentina x200; D: Cromogranina A x200; E: Sinaptofisina x400; F: SSTR2 x200; G: NTR1 x200. Barra de escala: 10 µm.126
- Figura 19 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica celular após 72horas de quimioterapia com everolimus. A: CK5.6 x200; B: AE1/AE3 x200; C: Vimentina x200; D: Cromogranina A x400; E: Sinaptofisina x400; F: SSTR2 x400; G: NTR1 x400. Barra de escala: 10 µm.126
- Figura 20 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica após 72horas de quimioterapia com docetaxel. A: CK5.6 x200; B: AE1/AE3 x200; C: Cromogranina A x200; D: CD56 x400. Barra de escala: 10 µm.127

- Figura 21 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72 horas de quimioterapia com sunitinib. A: CK5.6 x200; B: AE1/AE3 x200; C: E-caderina x200; D: Vimentina x200; E: Cromogranina A x200; F: CD56 x200; G: Sinaptofisina x200; H: SSTR2 x200; I: NTR1 x200. Barra de escala: 10 μ m.130
- Figura 22 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72 horas de quimioterapia com gemcitabina. A: CK5.6 x200; B: E-caderina x200; C: Vimentina x200; D: Sinaptofisina x400; E: SSTR2 x200. Barra de escala: 10 μ m.130
- Figura 23 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72 horas de quimioterapia com 5-FU. A: CK5.6 x200; B: AE1/AE3 x400; C: Vimentina x200; D: Cromogranina A x200; E: CD56 x200; F: Sinaptofisina x200; G: SSTR2 x200; H: NTR1 x200. Barra de escala: 10 μ m. 131
- Figura 24 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72 horas de quimioterapia com everolimus. A: CK5.6 x400; B: AE1/AE3 x400; C: Vimentina x400; D: Sinaptofisina x200; E: NTR1 x400. Barra de escala: 10 μ m.131
- Figura 25 - PANC-1: Imunohistoquímica após 72 horas de quimioterapia com docetaxel. A: CK5.6 x400; B: AE1/AE3 x400; C: Cromogranina A x400; D: SSTR2 x200. Barra de escala: 10 μ m.132
- Figura 26 - Comparação da expressão dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5, na linha celular MIA PaCa-2, após incubação destas células durante 72 h com o IC50 das 72h, dos citostáticos gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel. As colunas representam as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o desvio padrão.134
- Figura 27 - Comparação da expressão dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5, na linha celular PANC-1, após incubação destas células durante 72 h com o IC50 das 72h, dos citostáticos gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitinib e docetaxel. As colunas representam as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o desvio padrão.136
- Figura 28 - Comparação da expressão dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 entre as linhas MIA PaCa-2 e PANC-1, em função do controlo e dos fármacos gemcitabina, 5-FU, everolimus, docetaxel e sunitinib. 139
- Figura 29 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica dos xenotransplantes. A: CK5.6 x400; B: AE1/AE3 x400; C: E-caderina x400; D: Vimentina x200; E: Cromogranina A x400; F: CD56 x400; G: Sinaptofisina x400; H: SSTR2 x400; I: NTR1 x400. Barra de escala: 100 μ m.144
- Figura 30 - PANC-1: Imunohistoquímica dos xenotransplantes. A: CK5.6 x400; B: AE1/AE3 x200; C: E-caderina x100; D: Vimentina x400; E: Cromogranina A x400; F: CD56 x400; G: Sinaptofisina x400; H: SSTR2 x400; I: NTR1 x400. Barra de escala: 100 μ m. 144

Índice de Gráficos

- Gráfico 1 - Marcadores imunohistoquímicos das células grandes das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).77
- Gráfico 2 - Marcadores imunohistoquímicos das células pequenas das linhas celulares MIA PaCa-2 e PANC-1. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).77
- Gráfico 3 - Captação do ^{99m}Tc -Tektrotyde (^{99m}Tc -TOC), ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE ao longo do tempo pelas células da linha MIA PaCa-2. Na figura encontram-se representadas as médias dos valores obtidos em cada instante, juntamente com o desvio padrão. As linhas representam linhas de tendência, traduzidas pela função exponencial $y = A(1 - e^{-\lambda t})$, em que A traduz o máximo de captação atingido e λ é uma constante relacionada com a velocidade de captação.90
- Gráfico 4 - Captação do ^{99m}Tc -Tektrotyde (^{99m}Tc -TOC), ^{68}Ga -DOTA-NOC e ^{177}Lu -DOTA-TATE ao longo do tempo pelas células da linha PANC-1. Na figura encontram-se representadas as médias dos valores obtidos em cada instante, juntamente com o desvio padrão. As linhas representam linhas de tendência, traduzidas pela função exponencial $y = A(1 - e^{-\lambda t})$, em que A traduz o máximo de captação atingido e λ é uma constante relacionada com a velocidade de captação.91
- Gráfico 5 - Gráfico 5 - Distribuição dos recetores de somatostatina SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 nas células da linha celular MIA PaCa-2.....92
- Gráfico 6 - Distribuição dos recetores SSTR1, SSTR2a, SSTR2b, SSTR3, SSTR4 e SSTR5 nas células da linha celular PANC-1.....93
- Gráfico 7 - Curvas dose/resposta, em gráfico semi-logarítmico, para a gemcitabina, com tempos de incubação de 72 h e 96 h, na linha MIA PaCa2.95
- Gráfico 8 - Curvas dose/resposta, em gráfico semi-logarítmico, para a gemcitabina, com tempos de incubação de 72 h e 96 h, na linha PANC-1.95
- Gráfico 9 - Curvas dose/resposta, em gráfico semi-logarítmico, para o 5-FU, com tempos de incubação de 72 h e 96 h, na linha MIA PaCa 2.96
- Gráfico 10 - Curvas dose/resposta, em gráfico semi-logarítmico. para o 5-FU, com tempos de incubação de 72 h e 96 h, na linha PANC-1.....97
- Gráfico 11 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com everolimus para a linha MIA PaCa-2.....98
- Gráfico 12 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com everolimus para a linha PANC-1.98
- Gráfico 13 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com sunitib para a linha MIA PaCa2.99
- Gráfico 14 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com sunitib para a linha PANC-1.100

- Gráfico 15 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com sunitib para a linha MIA PaCa2.101
- Gráfico 16 - Curvas dose-resposta para as 24, 48, 72 e 96 h de incubação com sunitib para a linha PANC-1.102
- Gráfico 17 - Análise da viabilidade e da morte celulares na linha MIA PaCa-2 por citometria de fluxo, usando a dupla marcação com AV/PI. O gráfico representa a percentagem de células viáveis (V), em apoptose (A), em apoptose/necrose (A/N) e em necrose (N), após 72 h de incubação com as concentrações correspondente aos IC50 calculados para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. Os resultados exprimem a média de 3 experiências independentes, com as colunas representando a média da percentagem e as barras de erro são duas vezes o desvio padrão.103
- Gráfico 18 - Análise da viabilidade e da morte celulares na linha PANC-1 por citometria de fluxo, usando a dupla marcação com AV/PI. O gráfico representa a percentagem de células viáveis (V), em apoptose (A), em apoptose/necrose (A/N) e em necrose (N), após 72 h de incubação com as concentrações correspondente aos IC50 calculados para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. Os resultados exprimem a média de 3 experiências independentes, com as colunas representando a média da percentagem e as barras de erro são duas vezes o desvio padrão.104
- Gráfico 19 - Análise estatística da viabilidade e da morte celulares na linha MIA PaCa-2. O gráfico da esquerda apresenta os resultados da morte celular (%) por apoptose e por necrose, e o gráfico da direita a viabilidade (%), correspondentes ao efeito dos fármacos (gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitib e docetaxel) testadas. Cada gráfico representa a média e o intervalo correspondente a duas vezes o erro padrão da média.105
- Gráfico 20 - Análise estatística da viabilidade e da morte celulares na linha PANC-1. O gráfico da esquerda apresenta os resultados da morte celular (%) por apoptose e por necrose, e o gráfico da direita a viabilidade (%), correspondentes ao efeito dos fármacos (gemcitabina, 5-FU, everolimus, sunitib e docetaxel) testadas. Cada gráfico representa a média e o intervalo correspondente a duas vezes o erro padrão da média.106
- Gráfico 21 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo, usando a coloração com PI/RNase na linha celular MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em pré-G0, em G0/G1, em S e em G2/M, após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. Os resultados exprimem a média de 3 experiências independentes \pm 2 desvio padrão.....110
- Gráfico 22 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo, usando a coloração com PI/RNase na linha celular PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em pré-G0, em G0/G1, em S e em G2/M, após 72 h de incubação com as

- concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. Os resultados exprimem a média de 3 experiências independentes \pm 2 desvio padrão.....111
- Gráfico 23 - Análise estatística do ciclo celular na linha MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em pré-G0 após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.....112
- Gráfico 24 - Análise estatística do ciclo celular na linha MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em G0/G1 após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.....113
- Gráfico 25 - Análise estatística do ciclo celular na linha MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em fase S após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.....114
- Gráfico 26 - estatística do ciclo celular na linha MIA PaCa-2. O gráfico representa a percentagem de células em fase G2/M após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.....115
- Gráfico 27 - Análise estatística do ciclo celular na linha PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em pré-G0 após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.....116
- Gráfico 28 - Análise estatística do ciclo celular na linha PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em G0/G1 após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.....117
- Gráfico 29 - Análise estatística do ciclo celular na linha PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em fase S após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.....118
- Gráfico 30 - Análise estatística do ciclo celular na linha PANC-1. O gráfico representa a percentagem de células em fase G2/M após 72 h de incubação com as concentrações correspondentes aos IC50 para a gemcitabina, o 5-FU, o

- everolimus, o sunitinib e o docetaxel. O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o erro padrão.....119
- Gráfico 31 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica das células grandes, após modulação celular com citostáticos. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).
.....127
- Gráfico 32 - MIA PaCa-2: Imunohistoquímica das células pequenas, após modulação celular com citostáticos. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).128
- Gráfico 33 - PANC-1: Imunohistoquímica das células grandes, após modulação celular com citostáticos. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).133
- Gráfico 34 - PANC-1: Imunohistoquímica das células pequenas, após modulação celular com citostáticos. *Cut-off*: - (0% células), a + (<10%), ++ (10-75%) e +++ (>75%).
.....133
- Gráfico 35 - Estudos de captação com 25 μCi de ^{177}Lu -DOTA-TATE na linha celular MIA PaCa-2, após incubação destas células durante 24 h com os citostáticos gemcitabina (500 μM), 5-FU (120 μM), everolimus (1 μM), sunitinib (0,01 μM) e docetaxel (0,005 μM). O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o desvio padrão.140
- Gráfico 36 - Estudos de captação com 25 μCi de ^{177}Lu -DOTA-TATE na linha celular PANC-1, após incubação destas células durante 24 h com os citostáticos gemcitabina (500 μM), 5-FU (120 μM), everolimus (1 μM), sunitinib (0,01 μM) e docetaxel (0,005 μM). O gráfico representa as médias e as barras de erro são correspondentes a duas vezes o desvio padrão.141

Bibliografia

- Abdallah, H. M., A. M. Al-Abd, R. S. El-Dine, and A. M. El-Halawany, 2015, P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review: *J Adv Res*, v. 6, p. 45-62.
- Abrantes, A. M., M. E. Serra, A. C. Goncalves, J. Rio, B. Oliveiros, M. Laranjo, A. M. Rocha-Gonsalves, A. B. Sarmiento-Ribeiro, and M. F. Botelho, 2010, Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with 99mTc-MIBI and 99mTc-HL-91 uptake in colon cancer cells: *Nucl Med Biol*, v. 37, p. 125-32.
- Agarwal, A., and M. W. Saif, 2014, KRAS in pancreatic cancer: *Jop*, v. 15, p. 303-5.
- Alcock, R. A., S. Dey, D. Chendil, M. S. Inayat, M. Mohiuddin, G. Hartman, L. K. Chatfield, V. S. Gallicchio, and M. M. Ahmed, 2002, Farnesyltransferase inhibitor (L-744,832) restores TGF-beta type II receptor expression and enhances radiation sensitivity in K-ras mutant pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2: *Oncogene*, v. 21, p. 7883-90.
- Arumugam, T., V. Ramachandran, K. F. Fournier, H. Wang, L. Marquis, J. L. Abbruzzese, G. E. Gallick, C. D. Logsdon, D. J. McConkey, and W. Choi, 2009a, Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer: *Cancer Research*, v. 69, p. 5820-5828.
- Arumugam, T., V. Ramachandran, K. F. Fournier, H. Wang, L. Marquis, J. L. Abbruzzese, G. E. Gallick, C. D. Logsdon, D. J. McConkey, and W. Choi, 2009b, Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer: *Cancer Res*, v. 69, p. 5820-8.
- Barbieri, F., A. Bajetto, A. Pattarozzi, M. Gatti, R. Wurth, S. Thellung, A. Corsaro, V. Villa, M. Nizzari, and T. Florio, 2013, Peptide receptor targeting in cancer: the somatostatin paradigm: *Int J Pept*, v. 2013, p. 926295.
- Bartsch, D. K., P. Langer, N. Habbe, E. Matthai, B. Chaloupka, M. Sina, S. A. Hahn, and E. P. Slater, 2010, Clinical and genetic analysis of 18 pancreatic carcinoma/melanoma-prone families: *Clin Genet*, v. 77, p. 333-41.
- Becker, A. E., Y. G. Hernandez, H. Frucht, and A. L. Lucas, 2014, Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection: *World J Gastroenterol*, v. 20, p. 11182-98.
- Ben-Shlomo, A., K. Wawrowsky, and S. Melmed, 2010, Constitutive activity of somatostatin receptor subtypes: *Methods Enzymol*, v. 484, p. 149-64.
- Bergmann, L., L. Maute, G. Heil, J. Russel, E. Weidmann, D. Koberle, S. Fuxius, K. Weigang-Kohler, W. E. Aulitzky, B. Wormann, G. Hartung, B. Moritz, L. Edler, I. Burkholder, M. E. Scheulen, and H. Richly, 2015, A prospective randomised phase-II trial with gemcitabine versus gemcitabine plus sunitinib in advanced pancreatic cancer: a study of the CESAR Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIV: *Eur J Cancer*, v. 51, p. 27-36.
- Berlin, J. D., P. Catalano, J. P. Thomas, J. W. Kugler, D. G. Haller, and A. B. Benson, 3rd, 2002, Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297: *J Clin Oncol*, v. 20, p. 3270-5.
- Bernhard, J., D. Dietrich, W. Scheithauer, D. Gerber, G. Bodoky, T. Ruhstaller, B. Glimelius, E. Bajetta, J. Schuller, P. Saletti, J. Bauer, A. Figer, B. C. Pestalozzi, C. H. Kohne, W. Mingrone, S. M. Stemmer, K. Tamas, G. V. Kornek, D. Koeberle, and R. Herrmann, 2008, Clinical benefit and quality of life in patients with advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine plus capecitabine versus gemcitabine alone: a randomized multicenter phase III clinical trial--SAKK 44/00-CECOG/PAN.1.3.001: *J Clin Oncol*, v. 26, p. 3695-701.

- Beuran, M., I. Negoj, S. Paun, A. D. Ion, C. Bleotu, R. I. Negoj, and S. Hostiuc, 2015, The epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer: A systematic review: *Pancreatology*, v. 15, p. 217-225.
- Bhagwandin, V. J., and J. W. Shay, 2009, Pancreatic cancer stem cells: fact or fiction?: *Biochim Biophys Acta*, v. 1792, p. 248-59.
- Bilimoria, K. Y., D. J. Bentrem, C. Y. Ko, J. Ritchey, A. K. Stewart, D. P. Winchester, and M. S. Talamonti, 2007, Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database: *Cancer*, v. 110, p. 738-44.
- Bison, S. M., M. W. Konijnenberg, M. Melis, S. E. Pool, M. R. Bernsen, J. J. Teunissen, D. J. Kwekkeboom, and M. de Jong, 2014, Peptide receptor radionuclide therapy using radiolabeled somatostatin analogs: focus on future developments, *Clin Transl Imaging*, v. 2, p. 55-66.
- Blackford, A., O. K. Serrano, C. L. Wolfgang, G. Parmigiani, S. Jones, X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, J. R. Eshleman, M. Goggins, E. M. Jaffee, C. A. Iacobuzio-Donahue, A. Maitra, J. L. Cameron, K. Olino, R. Schulick, J. Winter, J. M. Herman, D. Laheru, A. P. Klein, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, and R. H. Hruban, 2009, SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer: *Clin Cancer Res*, v. 15, p. 4674-9.
- Borelli, I., G. C. Casalis Cavalchini, S. Del Peschio, M. Micheletti, T. Venesio, I. Sarotto, A. Allavena, L. Delsedime, M. A. Barberis, G. Mandrile, P. Berchiolla, P. Ogliara, C. Bracco, and B. Pasini, 2014, A founder MLH1 mutation in Lynch syndrome families from Piedmont, Italy, is associated with an increased risk of pancreatic tumours and diverse immunohistochemical patterns: *Fam Cancer*, v. 13, p. 401-13.
- Borson-Chazot, F., 2006, [Metabolic radiotherapy for gastroenteropancreatic endocrine tumors using radiolabeled somatostatin]: *Ann Endocrinol (Paris)*, v. 67, p. 198-204.
- Bosman, F. T., F. Carneiro, R. H. Hruban, and N. D. Theise, 2010, World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of The Digestive System.: Lyon, France, IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Brentnall, T. A., R. Chen, J. G. Lee, M. B. Kimmey, M. P. Bronner, R. C. Haggitt, K. V. Kowdley, L. M. Hecker, and D. R. Byrd, 1995, Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis: *Cancer Res*, v. 55, p. 4264-7.
- Brosens, L. A., W. M. Hackeng, G. J. Offerhaus, R. H. Hruban, and L. D. Wood, 2015, Pancreatic adenocarcinoma pathology: changing "landscape": *J Gastrointest Oncol*, v. 6, p. 358-74.
- Brugge, W. R., 2015, Diagnosis and management of cystic lesions of the pancreas: *J Gastrointest Oncol*, v. 6, p. 375-88.
- Buchegger, F., F. Bonvin, M. Kosinski, A. O. Schaffland, J. Prior, J. C. Reubi, P. Blauenstein, D. Tourwe, E. Garcia Garayoa, and A. Bischof Delaloye, 2003, Radiolabeled neurotensin analog, ^{99m}Tc-NT-XI, evaluated in ductal pancreatic adenocarcinoma patients: *J Nucl Med*, v. 44, p. 1649-54.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens, and D. D. Von Hoff, 1997, Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial: *J Clin Oncol*, v. 15, p. 2403-13.
- Cantore, M., C. Rabbi, G. Fiorentini, C. Oliani, D. Zamagni, C. Iacono, A. Mambrini, A. Del Freato, and A. Manni, 2004, Combined irinotecan and oxaliplatin in patients with advanced pre-treated pancreatic cancer: *Oncology*, v. 67, p. 93-7.
- Capello, A., E. Krenning, B. Bernard, J. C. Reubi, W. Breeman, and M. de Jong, 2005, ¹¹¹In-labelled somatostatin analogues in a rat tumour model: somatostatin receptor status

- and effects of peptide receptor radionuclide therapy: *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 32, p. 1288-95.
- Caplin, M., A. Sundin, O. Nilsson, R. P. Baum, K. J. Klose, F. Kelestimur, U. Plockinger, M. Papotti, R. Salazar, and A. Pascher, 2012, ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine neoplasms: colorectal neuroendocrine neoplasms: *Neuroendocrinology*, v. 95, p. 88-97.
- Capurso, G., M. Signoretti, R. Valente, U. Arnelo, M. Lohr, J. W. Poley, G. Delle Fave, and M. D. Chiaro, 2015, Methods and outcomes of screening for pancreatic adenocarcinoma in high-risk individuals: *World J Gastrointest Endosc*, v. 7, p. 833-42.
- Carraway, R. E., and A. M. Plona, 2006, Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools: *Peptides*, v. 27, p. 2445-60.
- Cartwright, T. H., A. Cohn, J. A. Varkey, Y. M. Chen, T. P. Szatrowski, J. V. Cox, and J. J. Schulz, 2002, Phase II study of oral capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer: *J Clin Oncol*, v. 20, p. 160-4.
- Cates, J. M., R. H. Byrd, L. E. Fohn, A. D. Tatsas, M. K. Washington, and C. C. Black, 2009, Epithelial-mesenchymal transition markers in pancreatic ductal adenocarcinoma: *Pancreas*, v. 38, p. e1-6.
- Ceranowicz, P., J. Cieszkowski, Z. Warzecha, B. Kusnierz-Cabala, and A. Dembinski, 2015, The Beginnings of Pancreatology as a Field of Experimental and Clinical Medicine: *Biomed Res Int*, v. 2015, p. 128095.
- Cescato, R., S. Schulz, B. Waser, V. Eltschinger, J. E. Rivier, H. J. Wester, M. Culler, M. Ginj, Q. Liu, A. Schonbrunn, and J. C. Reubi, 2006, Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists: *J Nucl Med*, v. 47, p. 502-11.
- Chakraborty, S., M. J. Baine, A. R. Sasson, and S. K. Batra, 2011, Current status of molecular markers for early detection of sporadic pancreatic cancer: *Biochim Biophys Acta*, v. 1815, p. 44-64.
- Chalabi, M., C. Duluc, P. Caron, D. Vezzosi, J. Guillermet-Guibert, S. Pyronnet, and C. Bousquet, 2014, Somatostatin analogs: does pharmacology impact antitumor efficacy?: *Trends Endocrinol Metab*, v. 25, p. 115-27.
- Chandra, R., and R. A. Liddle, 2014, Recent advances in the regulation of pancreatic secretion: *Curr Opin Gastroenterol*, v. 30, p. 490-4.
- Colucci, G., R. Labianca, F. Di Costanzo, V. Gebbia, G. Carteni, B. Massidda, E. Dapretto, L. Manzione, E. Piazza, M. Sannicolo, M. Ciaparrone, L. Cavanna, F. Giuliani, E. Maiello, A. Testa, P. Pederzoli, M. Falconi, C. Gallo, M. Di Maio, and F. Perrone, 2010, Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study: *J Clin Oncol*, v. 28, p. 1645-51.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, and M. Ducreux, 2011, FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: *N Engl J Med*, v. 364, p. 1817-25.
- Costa, F. P., B. Gumz, and B. Pasche, 2012, Selecting patients for cytotoxic therapies in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, v. 26, p. 843-54.
- Cullinan, S., C. G. Moertel, H. S. Wieand, A. J. Schutt, J. E. Krook, J. F. Foley, B. D. Norris, C. G. Kardinal, L. K. Tschetter, and J. F. Barlow, 1990, A phase III trial on the therapy of advanced pancreatic carcinoma. Evaluations of the Mallinson regimen and combined 5-fluorouracil, doxorubicin, and cisplatin: *Cancer*, v. 65, p. 2207-12.

- Cunningham, D., I. Chau, D. D. Stocken, J. W. Valle, D. Smith, W. Steward, P. G. Harper, J. Dunn, C. Tudur-Smith, J. West, S. Falk, A. Crellin, F. Adab, J. Thompson, P. Leonard, J. Ostrowski, M. Eatock, W. Scheithauer, R. Herrmann, and J. P. Neoptolemos, 2009, Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer: *J Clin Oncol*, v. 27, p. 5513-8.
- Dagrosa, M. A., M. Viaggi, J. Longhino, O. Calzetta, R. Cabrini, M. Edreira, G. Juvenal, and M. A. Pisarev, 2003, Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma: *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 57, p. 1084-92.
- Dasgupta, P., 2004, Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis: *Pharmacol Ther*, v. 102, p. 61-85.
- de la Chapelle, A., 2005, The incidence of Lynch syndrome: *Fam Cancer*, v. 4, p. 233-7.
- Deer, E. L., J. Gonzalez-Hernandez, J. D. Coursen, J. E. Shea, J. Ngatia, C. L. Scaife, M. A. Firpo, and S. J. Mulvihill, 2010, Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines: *Pancreas*, v. 39, p. 425-35.
- DeLellis, R. A., R. V. Lloyd, P. U. Heitz, and C. Eng, 2004, World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs.
- Demols, A., M. Peeters, M. Polus, R. Marechal, F. Gay, E. Monsaert, A. Hendlisz, and J. L. Van Laethem, 2006, Gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) in gemcitabine refractory advanced pancreatic adenocarcinoma: a phase II study: *Br J Cancer*, v. 94, p. 481-5.
- Des Guetz, G., O. Schischmanoff, P. Nicolas, G. Y. Perret, J. F. Morere, and B. Uzzan, 2009, Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis: *Eur J Cancer*, v. 45, p. 1890-6.
- Di Costanzo, F., P. Carlini, L. Doni, B. Massidda, R. Mattioli, A. Iop, E. Barletta, L. Moscetti, F. Recchia, P. Tralongo, and S. Gasperoni, 2005, Gemcitabine with or without continuous infusion 5-FU in advanced pancreatic cancer: a randomised phase II trial of the Italian oncology group for clinical research (GOIRC): *Br J Cancer*, v. 93, p. 185-9.
- Distler, M., D. Aust, J. Weitz, C. Pilarsky, and R. Grutzmann, 2014, Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN: *Biomed Res Int*, v. 2014, p. 474905.
- Dorado, J., E. Lonardo, I. Miranda-Lorenzo, and C. Heeschen, 2011, Pancreatic cancer stem cells: new insights and perspectives: *J Gastroenterol*, v. 46, p. 966-73.
- Dudeja, V., and P. J. Allen, 2015, Premalignant cystic neoplasms of the pancreas: *Semin Oncol*, v. 42, p. 70-85.
- Dumont, P., J. I. Leu, A. C. Della Pietra, 3rd, D. L. George, and M. Murphy, 2003, The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential: *Nat Genet*, v. 33, p. 357-65.
- Dunne, R. F., and A. F. Hezel, 2015, Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: *Hematol Oncol Clin North Am*, v. 29, p. 595-608.
- Duran-Prado, M., M. D. Gahete, M. Hergueta-Redondo, A. J. Martinez-Fuentes, J. Cordoba-Chacon, J. Palacios, F. Gracia-Navarro, G. Moreno-Bueno, M. M. Malagon, R. M. Luque, and J. P. Castano, 2012, The new truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 is associated to poor prognosis in breast cancer and increases malignancy in MCF-7 cells: *Oncogene*, v. 31, p. 2049-61.
- Duran-Prado, M., M. M. Malagon, F. Gracia-Navarro, and J. P. Castano, 2008, Dimerization of G protein-coupled receptors: new avenues for somatostatin receptor signalling, control and functioning: *Mol Cell Endocrinol*, v. 286, p. 63-8.
- Duran-Prado, M., A. Saveanu, R. M. Luque, M. D. Gahete, F. Gracia-Navarro, P. Jaquet, H. Dufour, M. M. Malagon, M. D. Culler, A. Barlier, and J. P. Castano, 2010, A potential inhibitory role for the new truncated variant of somatostatin receptor 5, sst5TMD4, in pituitary adenomas poorly responsive to somatostatin analogs: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95, p. 2497-502.
- Edge, S., B. DR, C. CC, F. AG, G. FL, and T. A, 2010, AJCC cancer staging manual: New York.

- Eheman, C., S. J. Henley, R. Ballard-Barbash, E. J. Jacobs, M. J. Schymura, A. M. Noone, L. Pan, R. N. Anderson, J. E. Fulton, B. A. Kohler, A. Jemal, E. Ward, M. Plescia, L. A. Ries, and B. K. Edwards, 2012, Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2008, featuring cancers associated with excess weight and lack of sufficient physical activity: *Cancer*, v. 118, p. 2338-66.
- Ehlers, R. A., S. Kim, Y. Zhang, R. T. Ethridge, C. Murrilo, M. R. Hellmich, D. B. Evans, C. M. Townsend, Jr., and B. Mark Evers, 2000, Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers: *Ann Surg*, v. 231, p. 838-48.
- Eisenhauer, E. A., P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, and J. Verweij, 2009, New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1): *Eur J Cancer*, v. 45, p. 228-47.
- Ellis, H., 2013, Anatomy of the pancreas and the spleen: *Surgery - Oxford International Edition*, v. 31, p. 263-266.
- Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death: *Toxicol Pathol*, v. 35, p. 495-516.
- Fisher, W. E., T. A. Doran, P. Muscarella, 2nd, L. G. Boros, E. C. Ellison, and W. J. Schirmer, 1998, Expression of somatostatin receptor subtype 1-5 genes in human pancreatic cancer: *J Natl Cancer Inst*, v. 90, p. 322-4.
- Fisher, W. E., Y. Wu, F. Amaya, and D. H. Berger, 2002, Somatostatin receptor subtype 2 gene therapy inhibits pancreatic cancer in vitro: *J Surg Res*, v. 105, p. 58-64.
- Fitzgerald, T. L., K. Lertpiriyapong, L. Cocco, A. M. Martelli, M. Libra, S. Candido, G. Montalto, M. Cervello, L. Steelman, S. L. Abrams, and J. A. McCubrey, 2015, Roles of EGFR and KRAS and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells: *Adv Biol Regul*.
- Fitzgerald, T. L., and J. A. McCubrey, 2014, Pancreatic cancer stem cells: association with cell surface markers, prognosis, resistance, metastasis and treatment: *Adv Biol Regul*, v. 56, p. 45-50.
- Flanagan, M. R., A. Jayaraj, W. Xiong, M. M. Yeh, W. H. Raskind, and V. G. Pillarisetty, 2015, Pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm in a patient with Lynch syndrome: *World J Gastroenterol*, v. 21, p. 2820-5.
- Forsell-Aronsson, E., J. Spetz, and H. Ahlman, 2013, Radionuclide therapy via SSTR: future aspects from experimental animal studies: *Neuroendocrinology*, v. 97, p. 86-98.
- Fraenkel, M., M. K. Kim, A. Faggiano, and G. D. Valk, 2012, Epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, v. 26, p. 691-703.
- Frank, T. S., X. Sun, Y. Zhang, J. Yang, W. E. Fisher, M. C. Gingras, and M. Li, 2015, Genomic profiling guides the choice of molecular targeted therapy of pancreatic cancer: *Cancer Lett*, v. 363, p. 1-6.
- Fujiyoshi, Y., and T. Eimoto, 2008, Chromogranin A expression correlates with tumour cell type and prognosis in signet ring cell carcinoma of the stomach: *Histopathology*, v. 52, p. 305-13.
- Furukawa, T., G. Kloppel, N. Volkan Adsay, J. Albores-Saavedra, N. Fukushima, A. Horii, R. H. Hruban, Y. Kato, D. S. Klimstra, D. S. Longnecker, J. Luttges, G. J. Offerhaus, M. Shimizu, M. Sunamura, A. Suriawinata, K. Takaori, and S. Yonezawa, 2005, Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study: *Virchows Arch*, v. 447, p. 794-9.
- Gabriel, M., C. Decristoforo, E. Donnemiller, H. Ulmer, C. Watfah Rychlinski, S. J. Mather, and R. Moncayo, 2003, An inpatient comparison of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC with ¹¹¹In-DTPA-octreotide for diagnosis of somatostatin receptor-expressing tumors: *J Nucl Med*, v. 44, p. 708-16.

- Garcia-Silva, S., J. Frias-Aldeguer, and C. Heeschen, 2013, Stem cells & pancreatic cancer: *Pancreatology*, v. 13, p. 110-3.
- Garrido-Laguna, I., and M. Hidalgo, 2015, Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies, *Nat Rev Clin Oncol*.
- Ghiorzo, P., 2014, Genetic predisposition to pancreatic cancer: *World J Gastroenterol*, v. 20, p. 10778-89.
- Ghosn, M., F. Farhat, J. Kattan, F. Younes, W. Moukadem, F. Nasr, and G. Chahine, 2007, FOLFIRI combination as the first-line treatment of locally advanced and/or metastatic pancreatic cancer: *Am J Clin Oncol*, v. 30, p. 15-20.
- Ginj, M., H. Zhang, B. Waser, R. Cescato, D. Wild, X. Wang, J. Erchegeyi, J. Rivier, H. R. Macke, and J. C. Reubi, 2006, Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 16436-41.
- Goldstein, A. M., M. Chan, M. Harland, E. M. Gillanders, N. K. Hayward, M. F. Avril, E. Azizi, G. Bianchi-Scarra, D. T. Bishop, B. Bressac-de Paillerets, W. Bruno, D. Calista, L. A. Cannon Albright, F. Demenais, D. E. Elder, P. Ghiorzo, N. A. Gruis, J. Hansson, D. Hogg, E. A. Holland, P. A. Kanetsky, R. F. Kefford, M. T. Landi, J. Lang, S. A. Leachman, R. M. Mackie, V. Magnusson, G. J. Mann, K. Niendorf, J. Newton Bishop, J. M. Palmer, S. Puig, J. A. Puig-Butille, F. A. de Snoo, M. Stark, H. Tsao, M. A. Tucker, L. Whitaker, and E. Yakobson, 2006, High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL: *Cancer Res*, v. 66, p. 9818-28.
- Gotink, K. J., and H. M. Verheul, 2010, Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?: *Angiogenesis*, v. 13, p. 1-14.
- Gourgou-Bourgade, S., C. Bascoul-Mollevi, F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, V. Boige, J. Berille, and T. Conroy, 2013, Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial: *J Clin Oncol*, v. 31, p. 23-9.
- Green, D. R., and G. Kroemer, 2009, Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53: *Nature*, v. 458, p. 1127-30.
- Gross, A., J. Schoendube, S. Zimmermann, M. Steeb, R. Zengerle, and P. Koltay, 2015, Technologies for Single-Cell Isolation: *Int J Mol Sci*, v. 16, p. 16897-919.
- Grover, S., and S. Syngal, 2010, Hereditary pancreatic cancer: *Gastroenterology*, v. 139, p. 1076-80, 1080.e1-2.
- Guastadisegni, C., M. Colafranceschi, L. Ottini, and E. Dogliotti, 2010, Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data: *Eur J Cancer*, v. 46, p. 2788-98.
- Guillemet-Guibert, J., H. Lahlou, S. Pyronnet, C. Bousquet, and C. Susini, 2005, Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Somatostatin receptors as tools for diagnosis and therapy: molecular aspects: *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, v. 19, p. 535-51.
- Guo, X. Z., Z. M. Cui, and X. Liu, 2013, Current developments, problems and solutions in the non-surgical treatment of pancreatic cancer: *World J Gastrointest Oncol*, v. 5, p. 20-8.
- Gutt, R., S. L. Liauw, and R. R. Weichselbaum, 2009, Adjuvant radiotherapy for resected pancreatic cancer: a lack of benefit or a lack of adequate trials?: *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, v. 6, p. 38-46.
- Hackert, T., M. W. Buchler, and J. Werner, 2011, Current state of surgical management of pancreatic cancer: *Cancers (Basel)*, v. 3, p. 1253-73.
- Halfdanarson, T. R., K. G. Rabe, J. Rubin, and G. M. Petersen, 2008a, Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival: *Ann Oncol*, v. 19, p. 1727-33.

- Halfdanarson, T. R., J. Rubin, M. B. Farnell, C. S. Grant, and G. M. Petersen, 2008b, Pancreatic endocrine neoplasms: epidemiology and prognosis of pancreatic endocrine tumors: *Endocr Relat Cancer*, v. 15, p. 409-27.
- Harinck, F., I. Kluijt, N. van der Stoep, R. A. Oldenburg, A. Wagner, C. M. Aalfs, R. H. Sijmons, J. W. Poley, E. J. Kuipers, P. Fockens, T. A. van Os, and M. J. Bruno, 2012, Indication for CDKN2A-mutation analysis in familial pancreatic cancer families without melanomas: *J Med Genet*, v. 49, p. 362-5.
- Hasskarl, J., M. Kaufmann, and H. A. Schmid, 2011, Somatostatin receptors in non-neuroendocrine malignancies: the potential role of somatostatin analogs in solid tumors: *Future Oncol*, v. 7, p. 895-913.
- Hay, N., and N. Sonenberg, 2004, Upstream and downstream of mTOR: *Genes Dev*, v. 18, p. 1926-45.
- Heinemann, V., D. Quietzsch, F. Gieseler, M. Gonnermann, H. Schonekas, A. Rost, H. Neuhaus, C. Haag, M. Clemens, B. Heinrich, U. Vehling-Kaiser, M. Fuchs, D. Fleckenstein, W. Gesierich, D. Uthgenannt, H. Einsele, A. Holstege, A. Hinke, A. Schalhorn, and R. Wilkowski, 2006, Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: *J Clin Oncol*, v. 24, p. 3946-52.
- Hermann, P. C., S. L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J. W. Ellwart, M. Guba, C. J. Bruns, and C. Heeschen, 2007, Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer: *Cell Stem Cell*, v. 1, p. 313-23.
- Herreros-Villanueva, M., E. Hijona, A. Cosme, and L. Bujanda, 2012, Adjuvant and neoadjuvant treatment in pancreatic cancer: *World J Gastroenterol*, v. 18, p. 1565-72.
- Herrmann, R., G. Bodoky, T. Ruhstaller, B. Glimelius, E. Bajetta, J. Schuller, P. Saletti, J. Bauer, A. Figer, B. Pestalozzi, C. H. Kohne, W. Mingrone, S. M. Stemmer, K. Tamas, G. V. Kornek, D. Koeberle, S. Cina, J. Bernhard, D. Dietrich, and W. Scheithauer, 2007, Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group: *J Clin Oncol*, v. 25, p. 2212-7.
- Hruban, R. H., A. Maitra, S. E. Kern, and M. Goggins, 2007, Precursors to pancreatic cancer: *Gastroenterol Clin North Am*, v. 36, p. 831-49, vi.
- Huang, P., S. Chubb, L. W. Hertel, G. B. Grindey, and W. Plunkett, 1991, Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis: *Cancer Res*, v. 51, p. 6110-7.
- Huang, P., C. Y. Wang, S. M. Gou, H. S. Wu, T. Liu, and J. X. Xiong, 2008, Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma: *World J Gastroenterol*, v. 14, p. 3903-7.
- Imhof, A., P. Brunner, N. Marincek, M. Briel, C. Schindler, H. Rasch, H. R. Macke, C. Rochlitz, J. Muller-Brand, and M. A. Walter, 2011, Response, survival, and long-term toxicity after therapy with the radiolabeled somatostatin analogue [90Y-DOTA]-TOC in metastasized neuroendocrine cancers: *J Clin Oncol*, v. 29, p. 2416-23.
- Jacobs, A. D., H. Otero, V. J. Picozzi, Jr., and D. M. Aboulafia, 2004, Gemcitabine combined with docetaxel for the treatment of unresectable pancreatic carcinoma: *Cancer Invest*, v. 22, p. 505-14.
- Jacobs, E. J., S. J. Chanock, C. S. Fuchs, A. Lacroix, R. R. McWilliams, E. Steplowski, R. Z. Stolzenberg-Solomon, A. A. Arslan, H. B. Bueno-de-Mesquita, M. Gross, K. Helzlsouer, G. Petersen, W. Zheng, I. Agalliu, N. E. Allen, L. Amundadottir, M. C. Boutron-Ruault, J. E. Buring, F. Canzian, S. Clipp, M. Dorransoro, J. M. Gaziano, E. L. Giovannucci, S. E. Hankinson, P. Hartge, R. N. Hoover, D. J. Hunter, K. B. Jacobs, M. Jenab, P. Kraft, C. Kooperberg, S. M. Lynch, M. Sund, J. B. Mendelsohn, T. Mouw, C. C. Newton, K. Overvad, D. Palli, P. H. Peeters, A. Rajkovic, X. O. Shu, G. Thomas, G. S. Tobias, D. Trichopoulos, J. Virtamo, J. Wactawski-Wende, B. M. Wolpin, K. Yu, and A. Zeleniuch-Jacquotte, 2010, Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: a pooled

- analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan): *Int J Cancer*, v. 127, p. 1421-8.
- Jaiswal, K. R., H. W. Xin, A. Anderson, G. Wiegand, B. Kim, T. Miller, D. Hari, S. Ray, T. Koizumi, U. Rudloff, S. S. Thorgeirsson, and I. Avital, 2012, Comparative testing of various pancreatic cancer stem cells results in a novel class of pancreatic-cancer-initiating cells: *Stem Cell Res*, v. 9, p. 249-60.
- Ji, B., L. Tsou, H. Wang, S. Gaiser, D. Z. Chang, J. Daniluk, Y. Bi, T. Grote, D. S. Longnecker, and C. D. Logsdon, 2009, Ras activity levels control the development of pancreatic diseases: *Gastroenterology*, v. 137, p. 1072-82, 1082.e1-6.
- Jiang, J. H., C. Liu, H. Cheng, Y. Lu, Y. Qin, Y. F. Xu, J. Xu, J. Long, L. Liu, Q. X. Ni, and X. J. Yu, 2015, Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer: Is it a clinically significant factor?: *Biochim Biophys Acta*, v. 1855, p. 43-49.
- Johnbeck, C. B., U. Knigge, and A. Kjaer, 2014, PET tracers for somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors: current status and review of the literature: *Future Oncol*, v. 10, p. 2259-77.
- Jones, S., X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S. M. Hong, B. Fu, M. T. Lin, E. S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D. R. Smith, M. Hidalgo, S. D. Leach, A. P. Klein, E. M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J. R. Eshleman, S. E. Kern, R. H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, and K. W. Kinzler, 2008, Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses: *Science*, v. 321, p. 1801-6.
- Kalluri, R., and R. A. Weinberg, 2009, The basics of epithelial-mesenchymal transition: *J Clin Invest*, v. 119, p. 1420-8.
- Kasajima, A., S. Yazdani, and H. Sasano, 2015, Pathology diagnosis of pancreatic neuroendocrine tumors: *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, v. 22, p. 586-93.
- Kastrinos, F., B. Mukherjee, N. Tayob, F. Wang, J. Sparr, V. M. Raymond, P. Bandipalliam, E. M. Stoffel, S. B. Gruber, and S. Syngal, 2009, Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome: *Jama*, v. 302, p. 1790-5.
- Kastrinos, F., and E. M. Stoffel, 2014, History, genetics, and strategies for cancer prevention in Lynch syndrome: *Clin Gastroenterol Hepatol*, v. 12, p. 715-27; quiz e41-3.
- Kimura, Y., J. Tsukada, T. Tomoda, H. Takahashi, K. Imai, K. Shimamura, M. Sunamura, Y. Yonemitsu, S. Shimodaira, S. Koido, S. Homma, and M. Okamoto, 2012, Clinical and immunologic evaluation of dendritic cell-based immunotherapy in combination with gemcitabine and/or S-1 in patients with advanced pancreatic carcinoma: *Pancreas*, v. 41, p. 195-205.
- Klein, A. P., M. de Andrade, R. H. Hruban, M. Bondy, A. G. Schwartz, S. Gallinger, H. T. Lynch, S. Syngal, K. G. Rabe, M. G. Goggins, and G. M. Petersen, 2007, Linkage analysis of chromosome 4 in families with familial pancreatic cancer: *Cancer Biol Ther*, v. 6, p. 320-3.
- Ko, A. H., H. Yousoufian, J. Gurtler, K. Dicke, O. Kayaleh, H. J. Lenz, M. Keaton, T. Katz, S. Ballal, and E. K. Rowinsky, 2012, A phase II randomized study of cetuximab and bevacizumab alone or in combination with gemcitabine as first-line therapy for metastatic pancreatic adenocarcinoma: *Invest New Drugs*, v. 30, p. 1597-606.
- Kondo, N. I., and Y. Ikeda, 2014, Practical management and treatment of pancreatic neuroendocrine tumors: *Gland Surg*, v. 3, p. 276-83.
- Korner, M., B. Waser, O. Strobel, M. Buchler, and J. C. Reubi, 2015, Neurotensin receptors in pancreatic ductal carcinomas: *EJNMMI Res*, v. 5, p. 17.
- Krausz, Y., N. Freedman, R. Rubinstein, E. Lavie, M. Orevi, S. Tshori, A. Salmon, B. Glaser, R. Chisin, E. Mishani, and J. G. D., 2011, ⁶⁸Ga-DOTA-NOC PET/CT imaging of neuroendocrine tumors: comparison with (1)(1)(1)In-DTPA-octreotide (OctreoScan(R)): *Mol Imaging Biol*, v. 13, p. 583-93.

- Kumar, U., and M. Grant, 2010, Somatostatin and somatostatin receptors: Results Probl Cell Differ, v. 50, p. 137-84.
- Kunz, P. L., D. Reidy-Lagunes, L. B. Anthony, E. M. Bertino, K. Brendtro, J. A. Chan, H. Chen, R. T. Jensen, M. K. Kim, D. S. Klimstra, M. H. Kulke, E. H. Liu, D. C. Metz, A. T. Phan, R. S. Sippel, J. R. Strosberg, and J. C. Yao, 2013, Consensus guidelines for the management and treatment of neuroendocrine tumors: Pancreas, v. 42, p. 557-77.
- Kwekkeboom, D. J., W. W. de Herder, B. L. Kam, C. H. van Eijck, M. van Essen, P. P. Kooij, R. A. Feelders, M. O. van Aken, and E. P. Krenning, 2008, Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177 Lu-DOTA 0,Tyr3]octreotate: toxicity, efficacy, and survival: J Clin Oncol, v. 26, p. 2124-30.
- Kwekkeboom, D. J., W. W. de Herder, C. H. van Eijck, B. L. Kam, M. van Essen, J. J. Teunissen, and E. P. Krenning, 2010, Peptide receptor radionuclide therapy in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: Semin Nucl Med, v. 40, p. 78-88.
- Laghi, L., S. Beghelli, A. Spinelli, P. Bianchi, G. Basso, G. Di Caro, A. Brecht, G. Celesti, G. Turri, S. Bersani, G. Schumacher, C. Rocken, I. Grantzdorffer, M. Roncalli, A. Zerbi, P. Neuhaus, C. Bassi, M. Montorsi, A. Scarpa, and A. Malesci, 2012, Irrelevance of microsatellite instability in the epidemiology of sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma: PLoS One, v. 7, p. e46002.
- Lang, C., S. Maschauer, H. Hubner, P. Gmeiner, and O. Prante, 2013, Synthesis and evaluation of a (18)F-labeled diarylpyrazole glycoconjugate for the imaging of NTS1-positive tumors: J Med Chem, v. 56, p. 9361-5.
- Lawrence, B., B. I. Gustafsson, A. Chan, B. Svejda, M. Kidd, and I. M. Modlin, 2011, The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: Endocrinol Metab Clin North Am, v. 40, p. 1-18, vii.
- Lawrence, T. S., A. W. Blackstock, and C. McGinn, 2003, The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents: Semin Radiat Oncol, v. 13, p. 13-21.
- Lee, C. J., J. Dosch, and D. M. Simeone, 2008, Pancreatic cancer stem cells: J Clin Oncol, v. 26, p. 2806-12.
- Lee, H. J., D. D. You, D. W. Choi, Y. S. Choi, S. J. Kim, Y. S. Won, and H. J. Moon, 2011, Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines: Journal of the Korean Surgical Society, v. 81.
- Li, C., D. G. Heidt, P. Dalerba, C. F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M. F. Clarke, and D. M. Simeone, 2007, Identification of pancreatic cancer stem cells: Cancer Res, v. 67, p. 1030-7.
- Li, X., Q. Ma, Q. Xu, W. Duan, J. Lei, and E. Wu, 2012, Targeting the cancer-stroma interaction: a potential approach for pancreatic cancer treatment: Curr Pharm Des, v. 18, p. 2404-15.
- Lin, F., Z. E. Chen, and H. L. Wang, 2015, Utility of immunohistochemistry in the pancreatobiliary tract: Arch Pathol Lab Med, v. 139, p. 24-38.
- Lin, J. H., and M. Yamazaki, 2003, Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications: Clin Pharmacokinet, v. 42, p. 59-98.
- Linder, S., K. Myrvold, U. G. Falkmer, G. Qvigstad, H. L. Waldum, and S. E. Falkmer, 2006, Neuroendocrine cells in pancreatic duct adenocarcinoma: an immunohistochemical study: J Exp Clin Cancer Res, v. 25, p. 213-21.
- Liu, Y., D. Lu, Y. Zhang, S. Li, X. Liu, and H. Lin, 2010, The evolution of somatostatin in vertebrates: Gene, v. 463, p. 21-8.
- Loos, M., J. Kleeff, H. Friess, and M. W. Buchler, 2008, Surgical treatment of pancreatic cancer: Ann N Y Acad Sci, v. 1138, p. 169-80.
- Lowery, M. A., D. P. Kelsen, Z. K. Stadler, K. H. Yu, Y. Y. Janjigian, E. Ludwig, D. R. D'Adamo, E. Salo-Mullen, M. E. Robson, P. J. Allen, R. C. Kurtz, and E. M. O'Reilly, 2011, An emerging entity: pancreatic adenocarcinoma associated with a known BRCA mutation:

- clinical descriptors, treatment implications, and future directions: *Oncologist*, v. 16, p. 1397-402.
- Lutz, M. P., E. Van Cutsem, T. Wagener, J. L. Van Laethem, U. Vanhoefer, J. A. Wils, E. Gamelin, C. H. Koehne, J. P. Arnaud, E. Mitry, F. Hussein, P. Reichardt, M. El-Serafi, P. L. Etienne, T. Lingenfeller, M. Praet, B. Genicot, M. Debois, B. Nordlinger, and M. P. Ducreux, 2005, Docetaxel plus gemcitabine or docetaxel plus cisplatin in advanced pancreatic carcinoma: randomized phase II study 40984 of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group: *J Clin Oncol*, v. 23, p. 9250-6.
- Macdonald, J. S., S. McCoy, R. P. Whitehead, S. Iqbal, J. L. Wade, 3rd, J. K. Giguere, and J. L. Abbruzzese, 2005, A phase II study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in pancreatic cancer: a Southwest oncology group (SWOG 9924) study: *Invest New Drugs*, v. 23, p. 485-7.
- Maertens, O., and K. Cichowski, 2014, An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer: *Adv Biol Regul*, v. 55, p. 1-14.
- Magee, J. A., E. Piskounova, and S. J. Morrison, 2012, Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty: *Cancer Cell*, v. 21, p. 283-96.
- Malvezzi, M., P. Bertuccio, T. Rosso, M. Rota, F. Levi, C. La Vecchia, and E. Negri, 2015, European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women?, *Ann Oncol*, v. 26: England, The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society for Medical Oncology For permissions, please email: journals.permissions@oup.com., p. 779-86.
- Mamede, A. C., A. S. Pires, A. M. Abrantes, S. D. Tavares, A. C. Goncalves, J. E. Casalta-Lopes, A. B. Sarmiento-Ribeiro, J. M. Maia, and M. F. Botelho, 2012, Cytotoxicity of ascorbic acid in a human colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr): in vitro and in vivo studies: *Nutr Cancer*, v. 64, p. 1049-57.
- Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R. A. Weinberg, 2008, The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells: *Cell*, v. 133, p. 704-15.
- Maraz, A., J. Furak, R. Palfoldi, J. Eller, E. Szanto, Z. Kahan, L. Thurzo, J. Molnar, L. Tiszlavicz, and K. Hideghety, 2011, Roles of BCL-2 and MDR1 expression in the efficacy of paclitaxel-based lung cancer chemoradiation: *Anticancer Res*, v. 31, p. 1431-6.
- Mazella, J., S. Beraud-Dufour, C. Devader, F. Massa, and T. Coppola, 2012, Neurotensin and its receptors in the control of glucose homeostasis: *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 3, p. 143.
- McKenna, L. R., and B. H. Edil, 2014, Update on pancreatic neuroendocrine tumors: *Gland Surg*, v. 3, p. 258-75.
- McWilliams, R. R., E. D. Wieben, K. G. Rabe, K. S. Pedersen, Y. Wu, H. Sicotte, and G. M. Petersen, 2011, Prevalence of CDKN2A mutations in pancreatic cancer patients: implications for genetic counseling: *Eur J Hum Genet*, v. 19, p. 472-8.
- Melguizo, C., J. Prados, R. Luque, R. Ortiz, O. Caba, P. J. Alvarez, B. Gonzalez, and A. Aranega, 2012, Modulation of MDR1 and MRP3 gene expression in lung cancer cells after paclitaxel and carboplatin exposure: *Int J Mol Sci*, v. 13, p. 16624-35.
- Melis, M., F. Forrer, A. Capello, M. Bijster, B. F. Bernard, J. C. Reubi, E. P. Krenning, and M. De Jong, 2007, Up-regulation of somatostatin receptor density on rat CA20948 tumors escaped from low dose [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate therapy: *Q J Nucl Med Mol Imaging*, v. 51, p. 324-33.
- Metz, D. C., and R. T. Jensen, 2008, Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors: *Gastroenterology*, v. 135, p. 1469-92.
- Moertel, C. G., S. Frytak, R. G. Hahn, M. J. O'Connell, R. J. Reitemeier, J. Rubin, A. J. Schutt, L. H. Weiland, D. S. Childs, M. A. Holbrook, P. T. Lavin, E. Livstone, H. Spiro, A. Knowlton, M.

- Kalser, J. Barkin, H. Lessner, R. Mann-Kaplan, K. Ramming, H. O. Douglas, Jr., P. Thomas, H. Nave, J. Bateman, J. Lokich, J. Brooks, J. Chaffey, J. M. Corson, N. Zamcheck, and J. W. Novak, 1981, Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5-fluorouracil), and high dose radiation + 5-fluorouracil: The Gastrointestinal Tumor Study Group: *Cancer*, v. 48, p. 1705-10.
- Moll, U. M., N. Marchenko, and X. K. Zhang, 2006, p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction: *Oncogene*, v. 25, p. 4725-43.
- Moore, P. S., B. Sipos, S. Orlandini, C. Sorio, F. X. Real, N. R. Lemoine, T. Gress, C. Bassi, G. Kloppel, H. Kalthoff, H. Ungefroren, M. Lohr, and A. Scarpa, 2001, Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4: *Virchows Arch*, v. 439, p. 798-802.
- Moorthy, N. S., S. F. Sousa, M. J. Ramos, and P. A. Fernandes, 2013, Farnesyltransferase inhibitors: a comprehensive review based on quantitative structural analysis: *Curr Med Chem*, v. 20, p. 4888-923.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays: *J Immunol Methods*, v. 65, p. 55-63.
- Muniraj, T., P. A. Jamidar, and H. R. Aslanian, 2013, Pancreatic cancer: a comprehensive review and update: *Dis Mon*, v. 59, p. 368-402.
- Muro, Y., K. Sugiura, T. Mimori, and M. Akiyama, 2015, DNA mismatch repair enzymes: genetic defects and autoimmunity: *Clin Chim Acta*, v. 442, p. 102-9.
- Murphy, K. M., S. Zhang, T. Geiger, M. J. Hafez, J. Bacher, K. D. Berg, and J. R. Eshleman, 2006, Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers: *J Mol Diagn*, v. 8, p. 305-11.
- Murtaugh, L. C., and S. D. Leach, 2007, A case of mistaken identity? Nonductal origins of pancreatic "ductal" cancers: *Cancer Cell*, v. 11, p. 211-3.
- Nakano, K., and K. H. Vousden, 2001, PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53: *Mol Cell*, v. 7, p. 683-94.
- Nakata, B., Y. Q. Wang, M. Yashiro, N. Nishioka, H. Tanaka, M. Ohira, T. Ishikawa, H. Nishino, and K. Hirakawa, 2002, Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer: *Clin Cancer Res*, v. 8, p. 2536-40.
- Nayak, T. K., R. W. Atcher, E. R. Prossnitz, and J. P. Norenberg, 2008, Enhancement of somatostatin-receptor-targeted (177)Lu-[DOTA(0)-Tyr(3)]-octreotide therapy by gemcitabine pretreatment-mediated receptor uptake, up-regulation and cell cycle modulation: *Nucl Med Biol*, v. 35, p. 673-8.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, C. Tudur Smith, C. Bassi, P. Ghaneh, E. Owen, M. Moore, R. Padbury, R. Doi, D. Smith, and M. W. Buchler, 2009, Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and -3(v1) trials: *Br J Cancer*, v. 100, p. 246-50.
- Neureiter, D., S. Zopf, A. Dimmler, S. Stintzing, E. G. Hahn, T. Kirchner, C. Herold, and M. Ocker, 2005, Different capabilities of morphological pattern formation and its association with the expression of differentiation markers in a xenograft model of human pancreatic cancer cell lines: *Pancreatology*, v. 5, p. 387-97.
- O'Reilly, E. M., D. Niedzwiecki, M. Hall, D. Hollis, T. Bekaii-Saab, T. Pluard, K. Douglas, G. K. Abou-Alfa, H. L. Kindler, R. L. Schilsky, and R. M. Goldberg, 2010, A Cancer and Leukemia Group B phase II study of sunitinib malate in patients with previously treated metastatic pancreatic adenocarcinoma (CALGB 80603): *Oncologist*, v. 15, p. 1310-9.
- Oberg, K., 2010, Pancreatic endocrine tumors: *Semin Oncol*, v. 37, p. 594-618.
- Oberg, K., G. Akerstrom, G. Rindi, and S. Jelic, 2010, Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up: *Ann Oncol*, v. 21 Suppl 5, p. v223-7.

- Oddstig, J., P. Bernhardt, O. Nilsson, H. Ahlman, and E. Forssell-Aronsson, 2006, Radiation-induced up-regulation of somatostatin receptor expression in small cell lung cancer in vitro: *Nucl Med Biol*, v. 33, p. 841-6.
- Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut, 2010, TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use: *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 2, p. a001008.
- Pandiri, A. R., 2014, Overview of exocrine pancreatic pathobiology: *Toxicol Pathol*, v. 42, p. 207-16.
- Piciucchi, M., G. Capurso, L. Archibugi, M. M. Delle Fave, M. Capasso, and G. Delle Fave, 2015, Exocrine pancreatic insufficiency in diabetic patients: prevalence, mechanisms, and treatment: *Int J Endocrinol*, v. 2015, p. 595649.
- Pinter, E., Z. Helyes, and J. Szolcsanyi, 2006, Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception: *Pharmacol Ther*, v. 112, p. 440-56.
- Porzner, M., and T. Seufferlein, 2011, Novel approaches to target pancreatic cancer: *Curr Cancer Drug Targets*, v. 11, p. 698-713.
- Pyronnet, S., C. Bousquet, S. Najib, R. Azar, H. Laklai, and C. Susini, 2008, Antitumor effects of somatostatin: *Mol Cell Endocrinol*, v. 286, p. 230-7.
- Rachakonda, P. S., A. S. Bauer, H. Xie, D. Campa, C. Rizzato, F. Canzian, S. Beghelli, W. Greenhalf, E. Costello, M. Schanne, A. Heller, A. Scarpa, J. P. Neoptolemos, J. Werner, M. Buchler, J. D. Hoheisel, K. Hemminki, N. Giese, and R. Kumar, 2013, Somatic mutations in exocrine pancreatic tumors: association with patient survival: *PLoS One*, v. 8, p. e60870.
- Rai, U., T. R. Thrimawithana, C. Valery, and S. A. Young, 2015, Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications: *Pharmacol Ther*, v. 152, p. 98-110.
- Raimondi, S., P. Maisonneuve, J. M. Lohr, and A. B. Lowenfels, 2007, Early onset pancreatic cancer: evidence of a major role for smoking and genetic factors: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 16, p. 1894-7.
- Rao, C. V., and A. Mohammed, 2015, New insights into pancreatic cancer stem cells: *World J Stem Cells*, v. 7, p. 547-55.
- Raymond, E., L. Dahan, J. L. Raoul, Y. J. Bang, I. Borbath, C. Lombard-Bohas, J. Valle, P. Metrakos, D. Smith, A. Vinik, J. S. Chen, D. Horsch, P. Hammel, B. Wiedenmann, E. Van Cutsem, S. Patyna, D. R. Lu, C. Blanckmeister, R. Chao, and P. Ruszniewski, 2011, Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors: *N Engl J Med*, v. 364, p. 501-13.
- Real, F. X., 2003, A "catastrophic hypothesis" for pancreas cancer progression: *Gastroenterology*, v. 124, p. 1958-64.
- Reid, M. D., B. Saka, S. Balci, A. S. Goldblum, and N. V. Adsay, 2014, Molecular genetics of pancreatic neoplasms and their morphologic correlates: an update on recent advances and potential diagnostic applications: *Am J Clin Pathol*, v. 141, p. 168-80.
- Reubi, J. C., 2003, Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy: *Endocr Rev*, v. 24, p. 389-427.
- Reubi, J. C., J. Ercegyi, R. Cescato, B. Waser, and J. E. Rivier, 2010, Switch from antagonist to agonist after addition of a DOTA chelator to a somatostatin analog: *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 37, p. 1551-8.
- Reubi, J. C., J. C. Schar, B. Waser, S. Wenger, A. Heppeler, J. S. Schmitt, and H. R. Macke, 2000, Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use: *Eur J Nucl Med*, v. 27, p. 273-82.
- Rhim, A. D., 2013, Epithelial to mesenchymal transition and the generation of stem-like cells in pancreatic cancer: *Pancreatology*, v. 13, p. 114-7.
- Ribic, C. M., D. J. Sargent, M. J. Moore, S. N. Thibodeau, A. J. French, R. M. Goldberg, S. R. Hamilton, P. Laurent-Puig, R. Gryfe, L. E. Shepherd, D. Tu, M. Redston, and S. Gallinger,

- 2003, Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer: *N Engl J Med*, v. 349, p. 247-57.
- Riley, T., E. Sontag, P. Chen, and A. Levine, 2008, Transcriptional control of human p53-regulated genes: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, p. 402-12.
- Rivlin, N., R. Brosh, M. Oren, and V. Rotter, 2011, Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis: *Genes Cancer*, v. 2, p. 466-74.
- Rosewicz, S., and B. Wiedenmann, 1997, Pancreatic carcinoma: *Lancet*, v. 349, p. 485-9.
- Rossi, R. E., J. Garcia-Hernandez, T. Meyer, C. Thirlwell, J. Watkins, N. G. Martin, M. E. Caplin, and C. Toumpanakis, 2015, Chromogranin A as a predictor of radiological disease progression in neuroendocrine tumours: *Ann Transl Med*, v. 3, p. 118.
- Rougier, P., H. Riess, R. Manges, P. Karasek, Y. Humblet, C. Barone, A. Santoro, S. Assadourian, L. Hatteville, and P. A. Philip, 2013, Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: *Eur J Cancer*, v. 49, p. 2633-42.
- Ruscica, M., M. Arvigo, L. Steffani, D. Ferone, and P. Magni, 2013, Somatostatin, somatostatin analogs and somatostatin receptor dynamics in the biology of cancer progression: *Curr Mol Med*, v. 13, p. 555-71.
- Ryan, D. P., T. S. Hong, and N. Bardeesy, 2014, Pancreatic adenocarcinoma: *N Engl J Med*, v. 371, p. 1039-49.
- Safran, H., D. Iannitti, R. Ramanathan, J. D. Schwartz, M. Steinhoff, C. Nauman, P. Hesketh, R. Rathore, R. Wolff, U. Tantravahi, T. M. Hughes, C. Maia, T. Pasquariello, L. Goldstein, T. King, J. Y. Tsai, and T. Kennedy, 2004, Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu: *Cancer Invest*, v. 22, p. 706-12.
- Saif, M. W., 2009, Adjuvant treatment of pancreatic cancer in 2009: where are we? Highlights from the 45th ASCO annual meeting. Orlando, FL, USA. May 29-June 2, 2009: *Jop*, v. 10, p. 373-7.
- Saiki, Y., and A. Horii, 2014, Molecular pathology of pancreatic cancer: *Pathol Int*, v. 64, p. 10-9.
- Schuller, J., J. Cassidy, E. Dumont, B. Roos, S. Durston, L. Banken, M. Utoh, K. Mori, E. Weidekamm, and B. Reigner, 2000, Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients: *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 45, p. 291-7.
- Shah, M., R. Da Silva, C. Gravekamp, S. K. Libutti, T. Abraham, and E. Dadachova, 2015, Targeted radionuclide therapies for pancreatic cancer: *Cancer Gene Ther*.
- Shah, M. A., and G. K. Schwartz, 2001, Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy: *Clin Cancer Res*, v. 7, p. 2168-81.
- Sharif, N., L. Gendron, J. Wowchuk, P. Sarret, J. Mazella, A. Beudet, and T. Stroh, 2007, Coexpression of somatostatin receptor subtype 5 affects internalization and trafficking of somatostatin receptor subtype 2: *Endocrinology*, v. 148, p. 2095-105.
- Shi, X., S. Liu, J. Kleeff, H. Friess, and M. W. Buchler, 2002, Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes: *Oncology*, v. 62, p. 354-62.
- Shirkoohi, R., 2013, Epithelial mesenchymal transition from a natural gestational orchestration to a bizarre cancer disturbance: *Cancer Sci*, v. 104, p. 28-35.
- Shrikhande, S. V., J. Kleeff, C. Reiser, J. Weitz, U. Hinz, I. Esposito, J. Schmidt, H. Friess, and M. W. Buchler, 2007, Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma: *Ann Surg Oncol*, v. 14, p. 118-27.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, and A. Jemal, 2015, Cancer statistics, 2015: *CA Cancer J Clin*, v. 65, p. 5-29.

- Singh, A., P. Greninger, D. Rhodes, L. Koopman, S. Violette, N. Bardeesy, and J. Settleman, 2009, A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival: *Cancer Cell*, v. 15, p. 489-500.
- Sliwiska-Mosson, M., M. Vesely, and H. Milnerowicz, 2014, The clinical significance of somatostatin in pancreatic diseases: *Ann Endocrinol (Paris)*, v. 75, p. 232-40.
- Soussi, T., 2003, p53 mutations and resistance to chemotherapy: A stab in the back for p73: *Cancer Cell*, v. 3, p. 303-5.
- Stathopoulos, G. P., K. Syrigos, G. Aravantinos, A. Polyzos, P. Papakotoulas, G. Fountzilas, A. Potamianou, N. Ziras, J. Boukovinas, J. Varthalitis, N. Androulakis, A. Kotsakis, G. Samonis, and V. Georgoulas, 2006, A multicenter phase III trial comparing irinotecan-gemcitabine (IG) with gemcitabine (G) monotherapy as first-line treatment in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: *Br J Cancer*, v. 95, p. 587-92.
- Stessin, A. M., J. E. Meyer, and D. L. Sherr, 2008, Neoadjuvant radiation is associated with improved survival in patients with resectable pancreatic cancer: an analysis of data from the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) registry: *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 72, p. 1128-33.
- Suraweera, N., A. Duval, M. Reperant, C. Vaury, D. Furlan, K. Leroy, R. Seruca, B. Iacopetta, and R. Hamelin, 2002, Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR: *Gastroenterology*, v. 123, p. 1804-11.
- Takaori, K., 2007, Current understanding of precursors to pancreatic cancer: *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, v. 14, p. 217-23.
- Tang, S. C., N. A. Lankheet, B. Poller, E. Wagenaar, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel, 2012, P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) restrict brain accumulation of the active sunitinib metabolite N-desethyl sunitinib: *J Pharmacol Exp Ther*, v. 341, p. 164-73.
- Tasdemir, E., M. C. Maiuri, I. Orhon, O. Kepp, E. Morselli, A. Criollo, and G. Kroemer, 2008, p53 represses autophagy in a cell cycle-dependent fashion: *Cell Cycle*, v. 7, p. 3006-11.
- Teague, A., K. H. Lim, and A. Wang-Gillam, 2015, Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies, *Ther Adv Med Oncol*, v. 7: England, p. 68-84.
- Tejpar, S., Z. Saridaki, M. Delorenzi, F. Bosman, and A. D. Roth, 2011, Microsatellite instability, prognosis and drug sensitivity of stage II and III colorectal cancer: more complexity to the puzzle, *J Natl Cancer Inst*, v. 103: United States, p. 841-4.
- Tezel, E., T. Nagasaka, S. Nomoto, H. Sugimoto, and A. Nakao, 2000, Neuroendocrine-like differentiation in patients with pancreatic carcinoma: *Cancer*, v. 89, p. 2230-6.
- Theodoropoulou, M., and G. K. Stalla, 2013, Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice: *Front Neuroendocrinol*, v. 34, p. 228-52.
- Thiebaut, F., T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, and M. C. Willingham, 1987, Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, p. 7735-8.
- van der Zwan, W. A., L. Bodei, J. Mueller-Brand, W. W. de Herder, L. K. Kvols, and D. J. Kwekkeboom, 2015, GEPNETs update: Radionuclide therapy in neuroendocrine tumors: *Eur J Endocrinol*, v. 172, p. R1-8.
- van Moorsel, C. J., H. M. Pinedo, G. Veerman, A. M. Bergman, C. M. Kuiper, J. B. Vermorcken, W. J. van der Vijgh, and G. J. Peters, 1999, Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines: *Br J Cancer*, v. 80, p. 981-90.
- Van Op den Bosch, J., D. Adriaensen, L. Van Nassauw, and J. P. Timmermans, 2009, The role(s) of somatostatin, structurally related peptides and somatostatin receptors in the gastrointestinal tract: a review: *Regul Pept*, v. 156, p. 1-8.

- Varadhachary, G. R., E. P. Tamm, J. L. Abbruzzese, H. Q. Xiong, C. H. Crane, H. Wang, J. E. Lee, P. W. Pisters, D. B. Evans, and R. A. Wolff, 2006, Borderline resectable pancreatic cancer: definitions, management, and role of preoperative therapy: *Ann Surg Oncol*, v. 13, p. 1035-46.
- Villard, L., A. Romer, N. Marincek, P. Brunner, M. T. Koller, C. Schindler, Q. K. Ng, H. R. Macke, J. Muller-Brand, C. Rochlitz, M. Briel, and M. A. Walter, 2012, Cohort study of somatostatin-based radiopeptide therapy with [(90)Y-DOTA]-TOC versus [(90)Y-DOTA]-TOC plus [(177)Lu-DOTA]-TOC in neuroendocrine cancers: *J Clin Oncol*, v. 30, p. 1100-6.
- Von Hoff, D. D., T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R. K. Ramanathan, J. Tabernero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias, and M. F. Renschler, 2013, Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine: *N Engl J Med*, v. 369, p. 1691-703.
- Wang, Y. J., J. M. Bailey, M. Rovira, and S. D. Leach, 2013, Sphere-forming assays for assessment of benign and malignant pancreatic stem cells: *Methods Mol Biol*, v. 980, p. 281-90.
- Waser, B., M. L. Tamma, R. Cescato, H. R. Maecke, and J. C. Reubi, 2009, Highly efficient in vivo agonist-induced internalization of sst2 receptors in somatostatin target tissues: *J Nucl Med*, v. 50, p. 936-41.
- Weckbecker, G., I. Lewis, R. Albert, H. A. Schmid, D. Hoyer, and C. Bruns, 2003, Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects: *Nat Rev Drug Discov*, v. 2, p. 999-1017.
- Wei, H. J., T. Yin, Z. Zhu, P. F. Shi, Y. Tian, and C. Y. Wang, 2011, Expression of CD44, CD24 and ESA in pancreatic adenocarcinoma cell lines varies with local microenvironment: *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, v. 10, p. 428-34.
- Wild, D., M. Fani, R. Fischer, L. Del Pozzo, F. Kaul, S. Krebs, J. E. Rivier, J. C. Reubi, H. R. Maecke, and W. A. Weber, 2014, Comparison of somatostatin receptor agonist and antagonist for peptide receptor radionuclide therapy: a pilot study: *J Nucl Med*, v. 55, p. 1248-52.
- Williams, A. S., and W. Y. Huang, 2013, The analysis of microsatellite instability in extracolonic gastrointestinal malignancy: *Pathology*, v. 45, p. 540-52.
- Wood, L. D., and R. H. Hruban, 2015, Genomic landscapes of pancreatic neoplasia: *J Pathol Transl Med*, v. 49, p. 13-22.
- Wu, Z., D. Martinez-Fong, J. Tredaniel, and P. Forgez, 2012, Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy: *Front Endocrinol (Lausanne)*, v. 3, p. 184.
- Xia, X., W. Wu, C. Huang, G. Cen, T. Jiang, J. Cao, K. Huang, and Z. Qiu, 2015, SMAD4 and its role in pancreatic cancer: *Tumour Biol*, v. 36, p. 111-9.
- Yao, J. C., M. H. Shah, T. Ito, C. L. Bohas, E. M. Wolin, E. Van Cutsem, T. J. Hobday, T. Okusaka, J. Capdevila, E. G. de Vries, P. Tomassetti, M. E. Pavel, S. Hoosen, T. Haas, J. Lincy, D. Lebowitz, and K. Oberg, 2011, Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors: *N Engl J Med*, v. 364, p. 514-23.
- Zhan, H. X., J. W. Xu, D. Wu, T. P. Zhang, and S. Y. Hu, 2015, Pancreatic cancer stem cells: new insight into a stubborn disease: *Cancer Lett*, v. 357, p. 429-37.
- Zhang, Y., J. Wei, H. Wang, X. Xue, Y. An, D. Tang, Z. Yuan, F. Wang, J. Wu, J. Zhang, and Y. Miao, 2012, Epithelial mesenchymal transition correlates with CD24+CD44+ and CD133+ cells in pancreatic cancer: *Oncol Rep*, v. 27, p. 1599-605.
- Zhu, Y. Y., and Z. Yuan, 2015, Pancreatic cancer stem cells: *Am J Cancer Res*, v. 5, p. 894-906.