

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Cancro Pancreático. Novos Biomarcadores.

Ana Carolina Faustino Martins

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Cristina Ferreira da Conceição
Ribeiro, Professora Auxiliar.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2022

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Cancro Pancreático. Novos Biomarcadores.

Ana Carolina Faustino Martins

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Ana Cristina Ferreira da Conceição
Ribeiro, Professora Auxiliar

2022

Resumo

Em 2020 o cancro do pâncreas, adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC), foi o oitavo cancro que registou maior mortalidade. O mau prognóstico da doença associa-se ao seu diagnóstico tardio, sendo que menos de 20% dos indivíduos são diagnosticados num estadio em que a resseção cirúrgica é possível, apesar da ausência de sintomas específicos. Assim, surge a necessidade de estabelecer uma estratégia que permita realizar o diagnóstico da doença num estadio inicial, de forma a aumentar a taxa de cura e de sobrevivência aos 5 anos.

Consequentemente, emerge a importância dos biomarcadores no diagnóstico precoce do cancro do pâncreas, uma vez que estes permitem estabelecer o diagnóstico e prognóstico da doença, assim como avaliar a sua resposta à terapêutica, de forma não invasiva e economicamente acessível. Atualmente, o antígeno carboidrato 19-9 (CA19-9) é o único biomarcador aprovado pela *Food and Drug Administration*, contudo este biomarcador apresenta limitações.

Nesta monografia procedeu-se à revisão bibliográfica dos biomarcadores descritos, capazes de estabelecer o diagnóstico precoce do cancro do pâncreas, com elevada sensibilidade e especificidade, bem como dos biomarcadores com valor prognóstico e terapêutico.

Palavras-chave: PDAC, biomarcador, diagnóstico precoce, CA19-9.

Abstract

In 2020, pancreatic cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), was the eighth cancer with the highest mortality. The poor prognosis of the disease is associated with its late diagnosis, with less than 20% of individuals diagnosed at a stage in which surgical resection is still possible, despite the absence of specific symptoms. Therefore, there is a need to establish a strategy that allows the early-stage diagnosis of the disease, in order to increase the rate of cure and the at 5-years survival rate.

Consequently, the importance of the early-stage biomarkers arises, since they allow establishing the diagnosis and prognosis of the disease, as well as evaluating its response to therapy, in a non-invasive and affordable way. Currently the carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) is the only biomarker approved by the Food and Drug Administration, however this biomarker as its limitations.

This monograph carried out a literature review of described biomarkers capable of performing the early diagnosis of pancreatic cancer, with high sensitivity and specificity, as well as biomarkers with prognostic and therapeutic value.

Keywords: PDAC, biomarker, early diagnosis, CA19-9.

Agradecimentos

Começo por agradecer à professora Doutora Ana Cristina Ribeiro, pela sua disponibilidade, tempo e orientação.

À minha família mais próxima, principalmente à minha mãe, pai e ao André, agradeço pela paciência e pelo apoio. Serão sempre o meu Lado Esquerdo.

Aos meus amigos de Leiria, agradeço por me darem sempre força para saltar mais alto. Aos amigos da FFUL, especialmente às minhas sete fantásticas, à Mariana e ao Diogo, fica a certeza de que nunca conseguirei agradecer o suficiente por terem sido a rede para todas as quedas e a força motriz de todas as minhas conquistas neste percurso.

Por último, e não menos importante, agradeço à equipa da Farmácia Aguiar pelo exemplo que foram e pela motivação extra que me deram nos últimos meses.

Abreviaturas

ADAMTS1- *ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 1*

ANGPTL2- *Angiopoietin-like 2*

APOA1- Apolipoproteína A1

APOE- Apolipoproteína E

APOL1- Apolipoproteína L1

ATM- *Ataxia telangiectasia mutated*

BNC1- *Basonuclin 1*

BRCA- *Breast Cancer gene*

CA19-9- Antígeno carboidrato 19-9

CASC2- *Cancer susceptibility candidate 2*

CCND2- ciclina D2

CDKN- *Cyclin-dependent kinase inhibitory*

CEA- Antígeno carcinoembrionário

CIM- Citocina inibidora de macrófagos

CPER- Colangiopancreatografia

endoscópica retrógrada

CPRM- Colangiopancreatografia por ressonância

CYP3A5- *Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 5*

DAPK1- *Death associated protein kinase 1*

DM- Diabetes Mellitus

DU-PAN2- *Duke pancreatic monoclonal antigen type 2*

EPCAM- *Epithelial cellular adhesion molecule*

ESMO- *European Society for Medical Oncology*

ESR1- *Estrogen Receptor 1*

GAS5- *Growth arrestspecific 5*

GPAM- *Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial*

GPR3- *G protein-coupled receptor 3*

HCP5- *Histocompatibility complex P5*

HOTTIP- *HOXA transcript at the distal tip*

HOST2- *Human ovarian cancer-specific transcript 2*

IDH- Índice de desenvolvimento humano

IMC- Índice de massa corporal

ITIH3- *Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3*

KLB- *Klotho beta*

KRAS- *Kirsten rat sarcoma viral*

LENG1- *Leukocyte receptor cluster member 1*

MUC2- Mucina 2

MRI- Ressonância magnética

MYOD1- *Myogenic differentiation 1*

NIPan- Neoplasia intraepitelial pancreática

NUPR1- *Nuclear protein 1*

PAICS- *Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase*

PDAC- *Pancretic ductal adenocarcinoma*

PGK- *Phosphoglycerate kinase 1*

PGR- *Progesterone receptor*

POSTN- Periostina

PPP1R15A- *Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A*

RB1- Retinoblastoma 1

RMN- Ressonância magnética nuclear
RNF138- *Ring finger protein 138*
RTEX- Radioterapia estereotáxica corporal
SMAD4- *Mothers against decapentaplegic homolog 4*
SNHG11- *Small nucleolar RNA host gene 11*
SOCS1- *Suppressor of cytokine signaling 1*
TCMD- Tomografia computadorizada com multidetectores
TEP- Tomografia por emissão de positrões

THBS1- *Thrombospondin 1*
TOR1B- *Torsin family 1 member B*
TP53- *tumor protein 53/ proteína tumoral 3*
TUG1- *Taurine-upregulated gene 1*
UCA1- *Urothelial cancer associated 1*
US- Ultrassonografia
USE- Ultrassonografia endoscópica
USE-AFA- Ultrassonografia endoscópica agulha fina de aspiração
VIH- Vírus da imunodeficiência humana

Índice

1. Introdução	14
1.1. Objetivos	15
1.2. Materiais e métodos	16
1.3. Cancro do Pâncreas	16
1.4. Epidemiologia	18
1.5. Etiologia	20
1.6. Métodos de diagnóstico.....	22
1.7. Tratamento	24
1.7.1 Tratamento da doença localizada	25
1.7.2 Tratamento da doença metastática.....	26
2. Carcinogénese Pancreática	27
2.1 Patologia.....	27
2.2 Patogénese.....	27
3. Estado de Arte do Diagnóstico do Cancro do Pâncreas.....	29
3.1. Biomarcadores.....	29
3.1.1 Biomarcadores Convencionais	29
3.1.1.1 Antígeno Carbohidrato 19-9 (CA19-9).....	29
3.1.1.2 Outros biomarcadores convencionais	31
3.1.2 Metabolitos	31
3.1.3. DNA livre de células	33
3.1.3.1 Mutações somáticas	33
3.1.3.2 Modulações epigenéticas	34
3.1.4 Fatores inflamatórios e Fatores de crescimento	35
3.1.5 RNA não codificante livre de células	36
3.1.5.1 Micro RNA	36
3.1.5.2. RNA longo não codificante	37
3.1.6 Autoanticorpos.....	38
3.1.7 Células Tumorais em Circulação (CTC)	40
3.1.8 Exossomas	41
3.2. Glicosilação no PDAC	43

3.2.1. Sialilação	43
3.2.2. Fucosilação	44
3.2.3. Alterações nas ramificações	45
3.3. Detecção de biomarcadores tumorais: lectinas	47
3.3.1 Aplicação de lectinas na deteção de biomarcadores tumorais.....	48
3.3.1.1. Cromatografia de afinidade com lectina imobilizada	48
3.3.1.2. Ensaio de Enzima ligada a Lectina	49
3.3.1.3. Histoquímica das lectinas	50
3.3.1.4. Blotting de lectinas	51
3.3.1.5. Array de lectinas	52
4. Conclusão	54
5. Perspetivas futuras	55
6. Referências Bibliográficas	56

Índice de Figuras

Figura 1: Mapa global que estabelece a relação causal entre o cancro e a morte prematura.....	14
Figura 2: Mecanismos envolvidos na génese do cancro.....	15
Figura 3: Localização e Metastização do PDAC.....	17
Figura 4: Taxa de Incidência global de PDAC 2020.....	18
Figura 5: Incidência global de PDAC em 2020.....	18
Figura 6: Taxa de incidência global do PDAC em ambos os sexos em 2020, padronizada para a idade..	19
Figura 7: Número de novos casos em 2020, em todas as idades, em ambos os sexos.	19
Figura 8: Número de mortes em 2020, em todas as idades, em ambos os sexos.....	19
Figura 9: Principais fatores de risco modificáveis.....	20
Figura 10: Síndromes hereditárias associadas ao risco de PDAC.	21
Figura 11: Métodos de diagnóstico de PDAC.	23
Figura 12: Recomendações para o diagnóstico de PDAC.	24
Figura 13: Pâncreas antes e depois do procedimento de Whipple.....	25
Figura 14: Histopatologia do adenocarcinoma pancreático.....	27
Figura 15: Progressão histológica e genética da NIPan.....	28
Figura 16: Biogénese dos exossomas.	41
Figura 17: Papel dos antigénios sLe ^A e sLe ^X na metastização do PDAC.	44
Figura 18: Cromatografia de afinidade com lectina imobilizada.....	49
Figura 19: Possíveis ensaios de enzima ligada a lectina.....	50
Figura 20: Técnicas utilizadas na histoquímica das lectinas.	51
Figura 21: <i>Blotting</i> de lectinas.	52
Figura 22: <i>Array</i> de lectinas.	53

Índice de tabelas

Tabela 1: Fatores de Risco modificáveis.	21
Tabela 2: Fatores de Risco não modificáveis.	22
Tabela 3: Tabela resumo dos biomarcadores associados ao CA19-9 no PDAC.....	31
Tabela 4: Tabela resumo dos metabolitos como biomarcadores no PDAC.....	32
Tabela 5: Tabela resumo de DNA livre de células como biomarcadores no PDAC	35
Tabela 6: Tabela resumo dos FI e FC como biomarcadores no PDAC	36
Tabela 7: Tabela resumo de RNA não codificante livre de células como biomarcadores do PDAC	38
Tabela 8: Tabela resumo de autoanticorpos como biomarcadores do PDAC.....	39
Tabela 9: Tabela resumo de CTC como biomarcadores do PDAC	41

Índice de anexos

Anexo 1: Critérios de Classificação do PDAC.....	69
Anexo 2: Regime Terapêutico para doença localizada em estadio avançado	69
Anexo 3: Regime Terapêutico de Manutenção	70
Anexo 4: Variantes morfológicas do PDAC	318

1. Introdução

O cancro é a principal causa de morte prematura em 134 dos 183 países, e classifica-se como a terceira ou quarta causa em outros 45 países (Figura 1) (1). Tem-se revelado nas últimas décadas um problema de saúde pública e para a economia mundial. Devido ao envelhecimento e crescimento populacional, espera-se que em 2040 existam 29 milhões de casos de cancro (2).

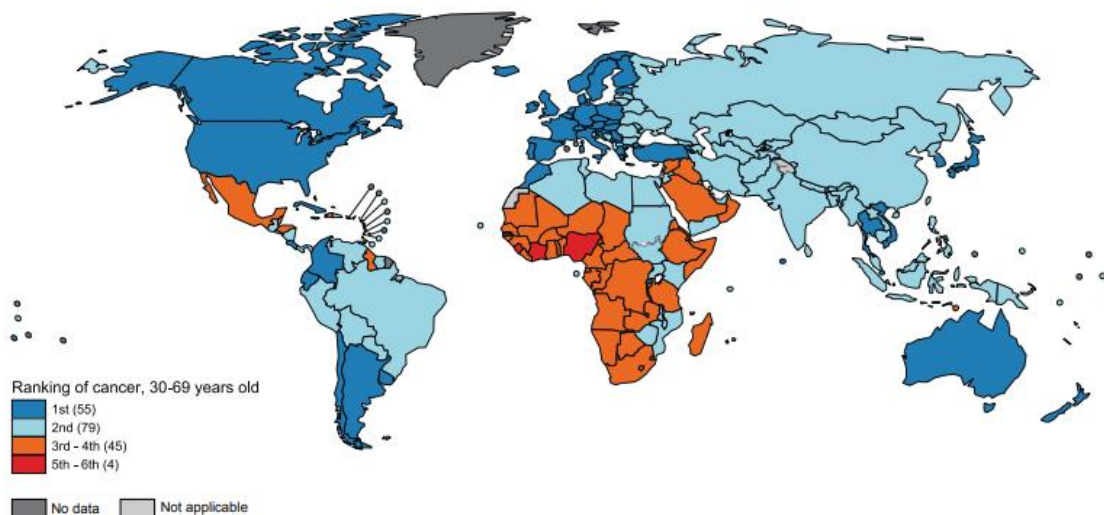


Figura 1: Mapa global que estabelece a relação causal entre o cancro e a morte prematura. Fonte: *Wild et al.*, 2020 (1).

As neoplasias são ocasionadas por uma alteração dos eventos reguladores da normal proliferação celular e da homeostase. Desta forma, surgem várias teorias referentes às possíveis alterações na fisiologia celular que podem levar ao desenvolvimento do cancro. Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram seis mecanismos que, no seu coletivo, poderiam desencadear o crescimento da massa tumoral: fatores de crescimento autossuficientes, insensibilidade aos fatores inibidores de crescimento, evasão da apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogénese sustentada e metastização (Figura 2) (3).

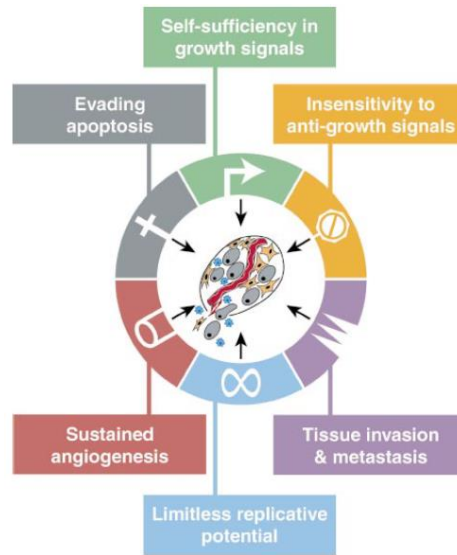


Figura 2: Mecanismos envolvidos na gênese do cancro. Fonte: Hanahan e Weinberg , 2000 (3).

Tendo em conta a tendência crescente do desenvolvimento de neoplasias na população global, as Nações Unidas estabeleceram uma meta (meta 3.4) no que respeita aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, que consiste na redução em um terço da morte prematura por cancro até 2030. Assim, um dos principais objetivos desta meta é a redução da exposição a fatores de risco que aumentam a predisposição para o desenvolvimento de neoplasias, nomeadamente os fatores de risco modificáveis, entre eles o tabagismo, alcoolismo e dietas pouco saudáveis (1). Para além disso, sabe-se que o diagnóstico precoce do cancro melhora o seu prognóstico. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos meios de deteção, sensíveis e específicos, realizados de forma não invasiva, que permitam fazer o rastreio da doença (4).

Um biomarcador é, por definição, uma característica que pode ser medida objetivamente e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos e da resposta a uma intervenção terapêutica (5). Assim, permitem, de forma não invasiva, fazer o diagnóstico precoce, bem como avaliar o estadio da doença e monitorizar tanto a sua evolução como a resposta ao tratamento (6).

1.1. Objetivos

O PDAC trata-se de um dos cancros com maior mortalidade. Este mau prognóstico, entre outros fatores, correlaciona-se com a sua dificuldade de diagnóstico.

Será o CA19-9, o único biomarcador aprovado pela FDA para o PDAC, o biomarcador mais eficaz no diagnóstico da doença? Quais os biomarcadores em estudo capazes de aumentar

especificidade do CA19-9? Estas serão as questões orientadoras desta revisão, de forma a: compreender a etiologia e o metabolismo da doença; explorar os biomarcadores em estudo e os seus métodos de deteção; observar o potencial destes biomarcadores para o diagnóstico precoce e prognóstico, bem como para a terapêutica do PDAC.

1.2. Materiais e métodos

Para a realização desta revisão bibliográfica foi feita pesquisa nas bases de dados PubMed, Google e Google Scholar. Para realizar a pesquisa, utilizaram-se como palavras-chave: *pancreatic cancer, biomarkers, CA19-9, early diagnosis, glycosylation e lectins*. Selecionaram-se 120 artigos, tendo por base a leitura dos seus títulos e resumos. Incluem-se nesta enumeração referências consideradas relevantes pelos artigos encontrados através da pesquisa das palavras-chave. Excetuando 21 artigos, cujo leitura foi imprescindível, excluíram-se todos os artigos publicados antes de 2010.

De forma a complementar a informação obtida através dos dados digitais, recorreu-se a alguns livros. Primou-se pela leitura das versões mais recentes.

Para gerar as citações e as referências bibliográficas recorreu-se ao *software* Mendeley, de acordo com as normas de referenciação de Vancouver.

1.3. Cancro do Pâncreas

O pâncreas é um órgão sólido localizado a nível retroperitoneal, na região do epigastro. Está dividido em quatro partes: cabeça, pescoço, corpo e cauda (7) (Figura 3).

É uma glândula com função endócrina e exócrina. O pâncreas exócrino apresenta ácinos que, através do ducto pancreático, secretam o suco pancreático para o duodeno. Neste suco encontram-se enzimas que quando ativadas são essenciais para a digestão dos alimentos e para a sua absorção a nível intestinal. O pâncreas endócrino é constituído pelos ilhéus de Langerhans, onde se encontram vários tipos de células produtoras de hormonas (7).

A maioria das patologias do pâncreas exócrino envolvem inflamação, neoplasia ou obstrução do ducto pancreático (7) (Figura 3).

Em novembro de 2020 o adenocarcinoma ductal do pâncreas (PDAC) foi declarado pela *United European Gastroenterology* como uma doença de emergência médica (8). É caracterizado pela sua rápida progressão, agressividade e opções limitadas de tratamento (9).

O PDAC é o cancro do aparelho digestivo que apresenta a menor taxa de sobrevivência ao primeiro e quinto ano, sendo que apenas 5 a 10% dos doentes diagnosticados sobrevive por 5 anos. Entre os cancros mais comuns, o PDAC é o que apresenta menor taxa de sobrevivência com uma expectativa de vida inferior a 5 anos após o diagnóstico (10). O diagnóstico ocorre geralmente quando a doença se encontra num estadio avançado, estimando-se que 80% a 90% dos doentes sejam diagnosticados numa fase em que já não é possível o seu tratamento. Assim, postula-se que um diagnóstico precoce permite fazer a ressecção curativa associada a quimioterapia, aumentando a taxa de sobrevivência aos 5 anos (4). Em toda a Europa, o número de casos de PDAC quase duplicou nas últimas três décadas, prevendo-se que tanto o número de diagnósticos como o número de mortes aumente em 40% até 2035 (10).

Podemos relacionar o mau prognóstico do PDAC com a sua dificuldade de diagnóstico, uma vez que é uma doença associada a sintomas não específicos, como dor abdominal, dor dorsal e perda ponderal (8). Assim, os sintomas são dificilmente detetados em estadios iniciais, sendo que a doença muitas vezes é diagnosticada quando já ocorreu metastização para os gânglios linfáticos ou para outras regiões anatómicas (Figura 3). O PDAC pode localizar-se na cabeça ou no corpo do pâncreas. Quando se localiza na cabeça do pâncreas a obstrução do ducto biliar é um sintoma comum e precoce. Contudo, quando se localiza no corpo do pâncreas, os sintomas apenas surgem quando a doença já se encontra num estadio mais avançado (9).

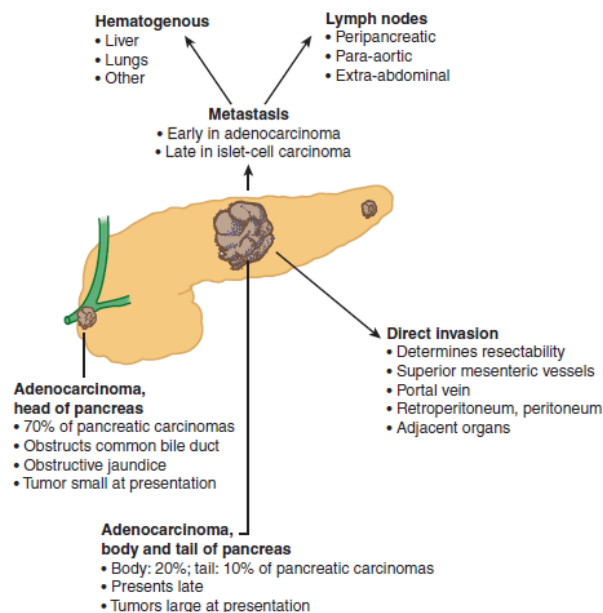


Figura 3: Localização e Metastização do PDAC.

Fonte: Khalili *et al*, 2015 (7).

1.4. Epidemiologia

O PDAC é um dos tipos de cancro mais mortal (1). O diagnóstico em estadios avançados, a resistência à quimioterapia e radioterapia, bem como a agressividade intrínseca da doença, que se manifesta com metastização bastante precoce, contribuem para o mau prognóstico do PDAC (7). Em 2020 houve um maior número de casos na Ásia Oriental e Europa Ocidental (11) (Figura 4).

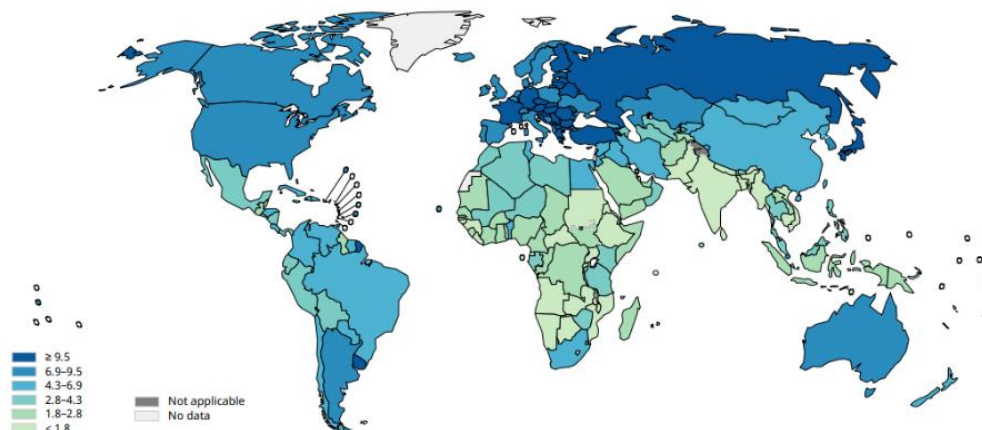


Figura 4: Taxa de Incidência global de PDAC, em 2020.

Fonte: IARC, 2020 (11).

Quando se estudam as tendências e padrões do cancro é importante utilizar unidades de medida de qualidade de desenvolvimento humano. Assim, é útil utilizar o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Este índice baseia-se em três aspetos: uma vida longa e saudável (tendo em conta a esperança de vida à nascença), o nível de escolaridade (tendo em conta a escolaridade média e esperada) e um nível de vida adequado (tendo por base o rendimento nacional bruto *per capita*) (1). Relativamente ao PDAC, há uma maior incidência em países com o IDH elevado e muito elevado (11).

Em 2020, a taxa de incidência em ambos os sexos foi superior na Ásia (47,1%) e Europa (28,3%) e inferior em África (3,4%) e Oceania (1,1%) (8) (Figura 5).

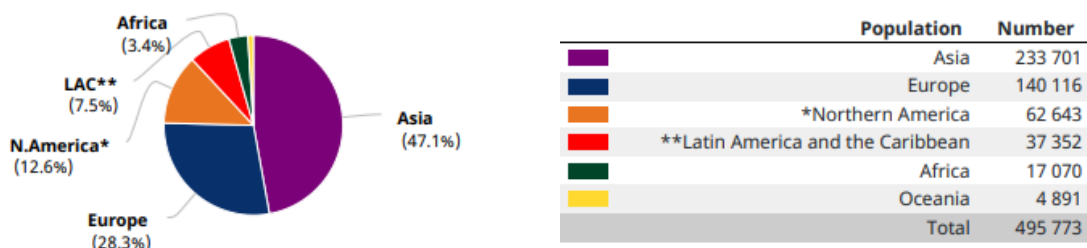


Figura 5: Incidência global de PDAC em 2020.

Fonte: IARC, 2020 (11).

O PDAC normalmente surge a partir dos 50 anos e a incidência aumenta com a idade, sendo que a maioria dos diagnósticos ocorre entre os 60 e os 80 anos (7). A doença é mais prevalente no sexo masculino (11) (Figura 6).

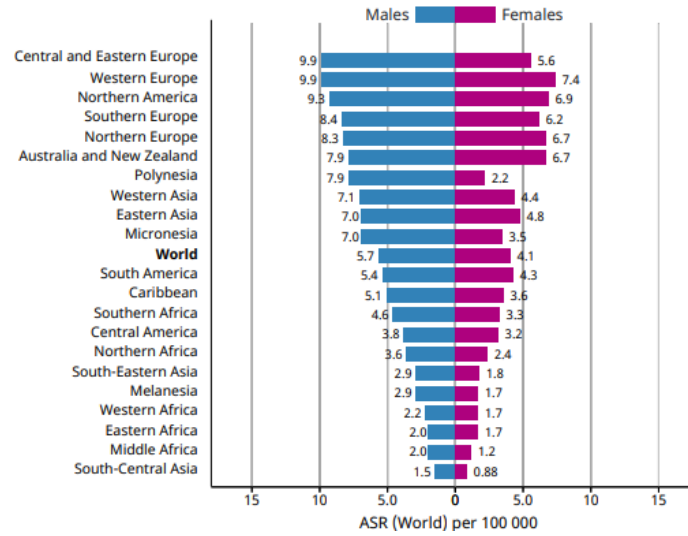


Figura 6: Taxa de incidência global do PDAC em ambos os sexos em 2020, padronizada para a idade. Fonte: IARC, 2020 (11).

Atualmente é o 12º cancro mais comum e a 8ª causa de morte de origem oncológica em ambos os sexos (11) (Figuras 7 e 8).

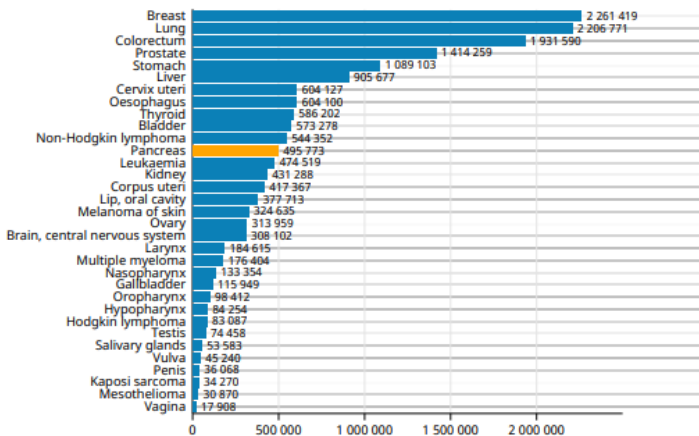


Figura 7: Número de novos casos em 2020, em todas as idades, em ambos os sexos. Fonte: IARC, 2020 (11).

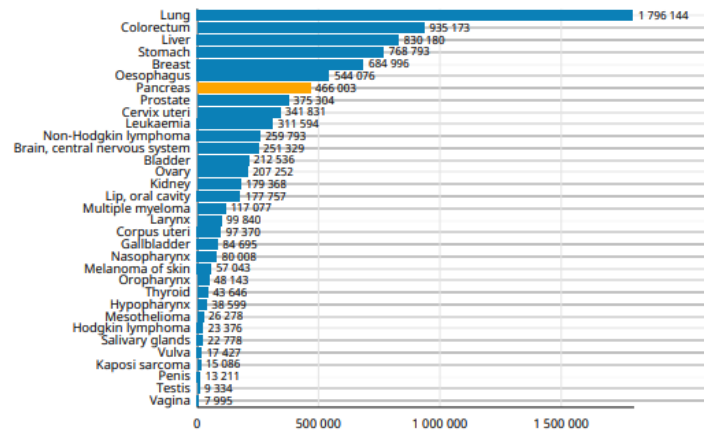


Figura 8: Número de mortes em 2020, em todas as idades, em ambos os sexos. Fonte: IARC, 2020 (11).

1.5. Etiologia

Apesar da sua etiologia específica não ser conhecida, sabe-se que existem vários fatores que aumentam o risco de PDAC. Estes podem ser divididos em modificáveis e não modificáveis. Entre os fatores de risco modificáveis encontram-se o tabagismo, a obesidade e o elevado consumo de gordura animal. Já no que diz respeito aos fatores de risco não modificáveis encontram-se a idade, o sexo, a predisposição genética e a presença de pancreatite crónica (9) (Tabela 1 e Tabela 2).

Entre os fatores de risco modificáveis conhecidos (Figura 9), o tabagismo é o mais documentado. Pensa-se que é a causa de cerca de 25% dos casos de PDAC, sendo que esta relação parece estar associada aos compostos N-nitrosos presentes no fumo do tabaco (1,7). Está documentada uma relação entre a dose e o risco, tal como o benefício da cessação tabágica (1). Para além do tabagismo, o Instituto Americano de Investigação do Cancro (IARC) sugere que pode existir uma relação entre a dieta, o sedentarismo e o risco aumentado de desenvolvimento de PDAC. Desta forma, refere que existe alguma evidência que a elevação deste risco possa estar associada ao elevado consumo de ácidos gordos saturados, carne vermelha, carnes processadas, bebidas alcoólicas (mais de três porções por dia) e alimentos com frutose (1,12). Vários estudos identificam a obesidade e a DM tipo 2 como fatores de risco para o PDAC, sendo a obesidade um fator de risco dependente da sua magnitude (1). Sabe-se que os indivíduos obesos apresentam um pior prognóstico e menor taxa de sobrevivência quando comparados a indivíduos não obesos (11).

Já foi documentada uma relação entre um maior risco de PDAC e a infeção por *Helicobacter pylori*, hepatite C e vírus da imunodeficiência humana (VIH) (13).

Factor	Relative risk	Attributable fraction
Tobacco	2	11%–32%
<i>Helicobacter pylori</i> infection	1.5	4%–25%
Obesity	1.2–1.5	3%–16%
Red meat intake	1.1–1.5	2%–9%
Heavy alcohol intake	1.1–1.5	9%
Low fruit and folate intake	0.5–1.0	<12%

Figura 9: Principais fatores de risco modificáveis.

Fonte: Ducreux *et al*, 2015 (13).

A identificação adequada dos fatores de risco modificáveis é essencial para o desenvolvimento de planos de prevenção primária do PDAC (1) (Figura 9).

Tabela 1: Fatores de risco modificáveis.

Tabagismo	Aumenta o risco em 75% de PDAC comparando com não fumadores (14).
Obesidade	Comparados a indivíduos com um índice de massa corporal (IMC) saudável, os obesos apresentam um risco 47% maior de PDAC (11).
Alcoolismo	Existe cada vez mais evidência que demonstra uma relação entre o alcoolismo e a PDAC (11).
Infeção	Foi estudada a relação entre o PDAC e a infeção por <i>Helicobacter pylori</i> e a hepatite C (13).

Relativamente aos fatores de risco não modificáveis, sabe-se que a DM tipo 2 tanto pode apresentar-se como um fator de risco para PDAC ou como uma das suas manifestações iniciais. Estudos indicam que a DM tipo 2 diagnosticada há mais de cinco anos pode ser um fator de risco, contudo, quando se trata de um diagnóstico recente, esta pode constituir uma das manifestações iniciais de PDAC. Posto isto, a DM tipo 2 encontra-se a ser estudada como um dos biomarcadores de deteção inicial desta patologia oncológica (1).

A história familiar e os fatores genéticos também parecem apresentar uma relação com o risco aumentado de desenvolver PDAC. Entre 8% a 10% dos doentes com PDAC apresentam uma linhagem patogénica de um gene de risco (Figura 10), porém, outros indivíduos apresentam dois ou mais familiares com história de PDAC sem que haja uma relação com um dos fatores de risco genético (1).

Syndrome	Genes mutated	Published risk estimates
Peutz–Jeghers syndrome	<i>STK11</i>	Cumulative risk: 32–36% by age 70 years
Familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome	<i>CDKN2A</i>	Cumulative risk: 17% by age 75 years
Familial pancreatic cancer	Unknown	Overall: SIR = 9.0 Three affected first-degree relatives: SIR = 32
Hereditary pancreatitis	<i>PRSS1</i>	Cumulative risk: 44% by age 70 years
Hereditary breast and ovarian cancer syndrome	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	Relative risk: 2.6 Relative risk: 3.5–5.9
Lynch syndrome	<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i> <i>ATM, PALB2</i>	Cumulative risk: 3–4% by age 70 years Unknown

SIR, standardized incidence ratio.

Figura 10: Síndromes hereditárias associadas ao risco de PDAC.

Fonte: Wild *et al*, 2020 (1).

Os indivíduos com pancreatite crónica, principalmente quando esta se trata de uma doença hereditária, apresentam um risco aumentado de desenvolver PDAC (11).

Tabela 2: Fatores de risco não modificáveis.

Idade	90% dos casos são diagnosticados após os 55 anos (12).
Diabetes	Indivíduos com diagnóstico de DM tipo 2 há menos de 4 anos apresentam um risco 50% maior de desenvolver PDAC quando comparados a indivíduos com o mesmo diagnóstico há mais de 5 anos (11).
Predisposição genética	O risco de PDAC aumenta entre 2 a 3 vezes quando há um diagnóstico na família (progenitores, irmãos ou filhos). Mais de 10% dos casos de PDAC estão associados a predisposição genética (11).
Pancreatite Crónica	4% dos indivíduos com pancreatite crónica desenvolve PDAC (11).

1.6. Métodos de diagnóstico

Um dos aspetos determinantes do mau prognóstico do PDAC é a dificuldade do seu diagnóstico. Existem vários fatores que contribuem para tal dificuldade, entre eles os sintomas não específicos e a elevada proximidade do pâncreas a vasos sanguíneos, que facilmente podem ser invadidos pela neoplasia e levar à metastização (14). Desta forma, a dificuldade de diagnóstico leva a que entre 80% a 90% dos PDAC não sejam passíveis de resseção aquando do diagnóstico (6,13).

Tal como mencionado anteriormente, as neoplasias localizadas no corpo e na cauda do pâncreas são diagnosticadas mais tardiamente. Por outro lado, por causarem obstrução do ducto pancreático ou biliar e, conseqüentemente, conduzirem a sintomas mais específicos, os tumores localizados na cabeça do pâncreas são diagnosticados mais precocemente (13).

Enquanto outras neoplasias apresentam métodos de diagnóstico bem estabelecidos, o mesmo não acontece no caso do PDAC, nem mesmo para a população considerada de risco (16). Atualmente, os métodos de diagnóstico mais utilizados são a ultrassonografia (US); ultrassonografia endoscópica (USE), com possibilidade de utilização de agulha fina de aspiração (USE-AFA); tomografia computadorizada com multidetektos (TCMD); ressonância magnética (MRI); colangiopancreatografia por ressonância (CPRM); colangiopancreatografia endoscópica retrógrada (CPER); tomografia por emissão de positrões (TEP); e biópsia (16) (Figura 11).

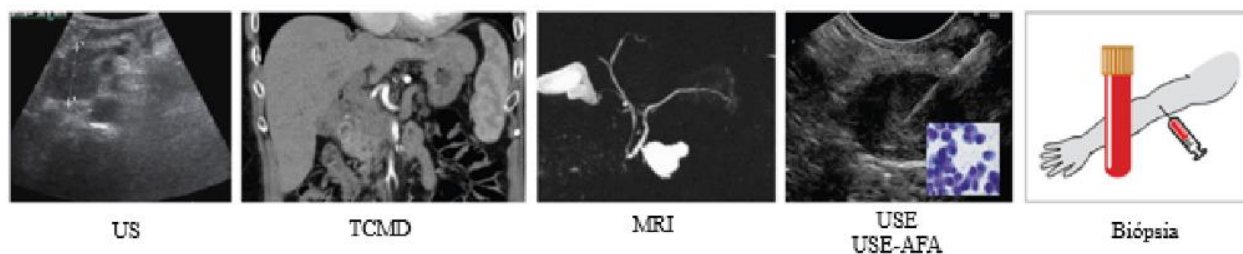


Figura 11: Métodos de diagnóstico de PDAC.
Fonte: Moutinho-Ribeiro *et al*, 2019 (16).

As *guidelines* internacionais consideram que o diagnóstico deve iniciar-se pela realização de TCMD ou RM, sendo que a escolha entre os métodos de diagnóstico deve ter por base o custo, a disponibilidade de equipamento e as capacidades da equipa médica, uma vez que não há superioridade demonstrada da RM relativamente à TCMD no diagnóstico do PDAC, dando-se preferência à TCMD (13,17) (Figura 11). Contudo, a RM é particularmente útil na deteção de lesões hepáticas não caracterizáveis pela TCMD ou quando há suspeita de tumores do pâncreas que não são visíveis através da TCMD (13,18).

Em 75% a 90% dos casos o PDAC surge na TCMD como uma massa hipodensa de margens indefinidas. Há várias evidências na TCMD que podem indicar a presença de PDAC e que permitem avaliar a extensão da lesão, como é o caso da obstrução do ducto biliar (13,19).

Segundo a Sociedade Europeia de Oncologia Médica (SEOM) (13), a biópsia (figura 12) deve ser realizada para o diagnóstico em doentes que têm indicação para quimioterapia. A SEOM refere ainda que a USE guiada por agulha fina deve ser realizada em casos de diagnóstico dúbio e que pode ser realizado como complemento à TCMD, não sendo um método utilizado com frequência (13,19).

Relativamente aos restantes métodos de diagnóstico referidos anteriormente, a SEOM considera que a CPER e a TEP não acrescentam valor diagnóstico à TCMD e à RM (13).

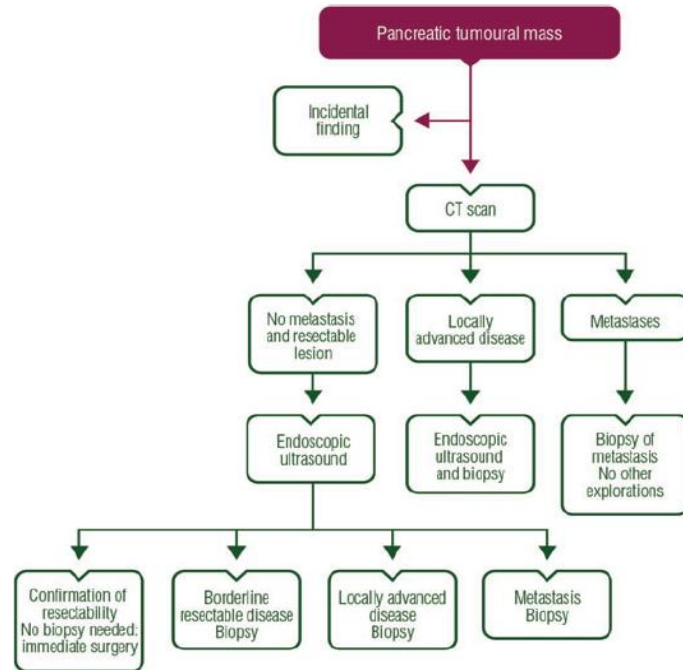


Figura 12: Recomendações para o diagnóstico de PDAC.

Fonte: Ducreux *et al*, 2015 (13).

1.7. Tratamento

Após o diagnóstico, o PDAC pode ser classificado como ressecável, ressecável limítrofe, localmente avançado ou doença metastática. Esta classificação apresenta critérios bem definidos, tendo em conta a proximidade entre a neoplasia e os vasos sanguíneos (Anexo 1) (13). Assim, a doença deve ser tratada de acordo com a sua classificação, devendo o plano terapêutico incluir ainda apoio psicológico, medidas de alívio da dor e apoio nutricional (18).

A cirurgia de ressecção é o tratamento com maior potencial curativo da doença, sendo que se demonstrou que a taxa de sobrevivência aumenta com a quimioterapia adjuvante. Contudo, menos de 20% dos doentes é diagnosticado num estadiu em que não é possível realizar cirurgia (13,15).

O principal objetivo da cirurgia é obter margens de ressecção negativas (R0). Assim, nos doentes com PDAC potencialmente ressecável a cirurgia é a terapêutica de primeira linha. Por outro lado, doentes com PDAC ressecável limítrofe apresentam uma elevada probabilidade de ressecção R1, pelo que o plano terapêutico passa inicialmente pela quimioterapia neoadjuvante e não pela cirurgia. Já os doentes com doença localmente avançada ou com doença metastática não são considerados elegíveis para cirurgia (19).

1.7.1 Tratamento da doença localizada

Nos casos em que o tumor se encontra localizado, ou seja, em doentes elegíveis para cirurgia, a resseção cirúrgica constitui a primeira linha de tratamento. O tipo de cirurgia é determinado pela localização e dimensão do tumor.

Assim, nos doentes com tumores localizados na cabeça do pâncreas procede-se a uma pancreatoduodenectomia através do procedimento de *Whipple* (Figura 13). O Grupo Internacional de Estudo de Cirurgia Pancreática recomenda a análise das margens anterior, posterior, do sulco mesentérico mediano ou superior, da artéria mesentérica superior, do pescoço do pâncreas, do ducto biliar e do intestino delgado (18,19).

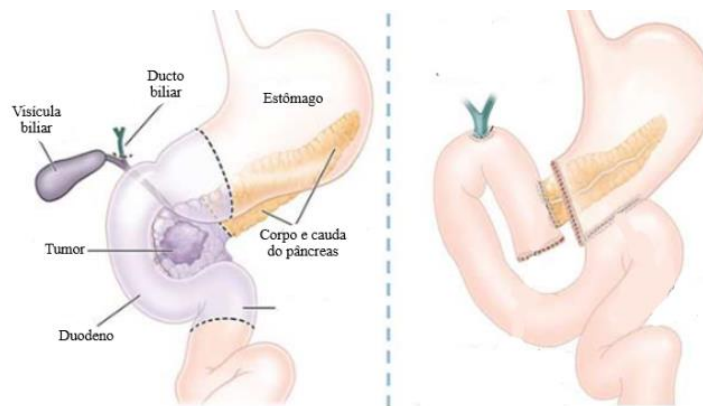


Figura 13: Pâncreas antes e depois do procedimento de *Whipple*.

Adaptado de <https://moffitt.org/cancers/pancreatic-cancer/treatment/surgery/whipple-procedure/>

Nos doentes com tumores localizados no corpo ou cauda do pâncreas realiza-se uma pancreatectomia distal, incluindo a resseção do corpo e cauda do pâncreas, bem como do baço. Nesta cirurgia, recomenda-se a análise das margens pancreáticas proximal, anterior e posterior.

Nos casos de doença localizada em estadios avançados, as *guidelines* da ESMO sugerem que o tratamento de primeira linha tenha em conta o prognóstico de cada doente.

Assim, os doentes que apresentem um bom prognóstico devem iniciar o tratamento por terapêutica sistémica; quimioterapia induzida seguida de quimiorradioterapia ou radioterapia estereotáxica corporal (RTEX). Nos doentes em que não seja possível fazer terapêutica combinada sugere-se a quimiorradiação ou RTEX.

Em caso de bom prognóstico e de doença sem progressão após a primeira fase do tratamento, pode considerar-se a resseção cirúrgica com ou sem quimioterapia adjuvante, ou continuar o tratamento sistémico. Por outro lado, se houver progressão da doença existe recomendação para a

continuação do tratamento sistémico ou para a quimiorradiação ou RTEEX, no caso de não terem sido opção terapêutica anteriormente.

Nos casos de mau prognóstico ou progressão da doença recomenda-se a realização de quimioterapia com um único agente ou terapêutica-alvo. De notar que alguns doentes beneficiam de cuidados paliativos (19).

1.7.2 Tratamento da doença metastática

A primeira linha de tratamento nos doentes em que já ocorreu metastização passa pela quimioterapia. Nestes casos a radioterapia não está indicada.

Assim, o regime terapêutico recomendado é o mesmo que aquele utilizado em indivíduos com doença localizada em estadio avançado (Anexo 2) (19). Quando os doentes respondem de forma positiva e há uma estabilização da doença após 4 a 6 meses de quimioterapia, pode optar-se por realizar terapêutica de manutenção (Anexo 3) (19).

2. Carcinogénese Pancreática

2.1 Patologia

O PDAC pode surgir na porção exócrina e endócrina do pâncreas, sendo que cerca de 95% dos casos surge na porção exócrina (13). Sabe-se ainda que o carcinoma é mais frequente na cabeça (70%) e pescoço (20%) do que na cauda (10%) do pâncreas (7).

Cerca de 90% dos PDAC tratam-se de adenocarcinomas (13), sendo que já foram caracterizadas diversas variantes morfológicas (7). Entre elas, destacam-se os carcinomas adenoescamoso, anaplásico, de células acinares, medular e hepatoide (Anexo 4) (15).

Trata-se de uma doença altamente displásica (Figura 14) em que ocorre um aumento da proliferação de fibroblastos alfa-actina do músculo liso, bem como um aumento da deposição de vários componentes da matriz celular, o que contribui para a sua resistência à quimioterapia. Para além desta resistência, a displasia pode levar a hipoxia, devido à compressão da vasculatura local, que consequentemente pode levar a reprogramação do metabolismo celular, inibição da apoptose, manutenção da proliferação e metastização (20).

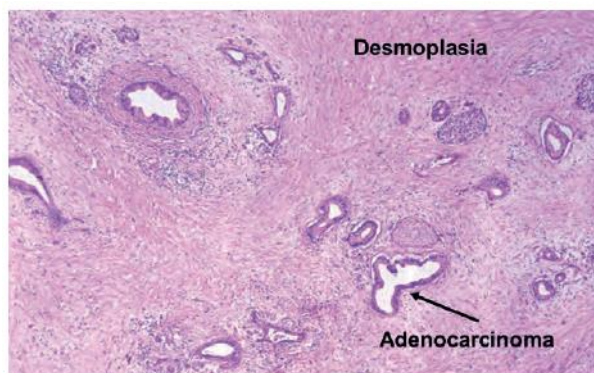


Figura 14: Histopatologia do adenocarcinoma pancreático.
Fonte: Wild *et al.*, 2020 (1).

2.2 Patogénese

À semelhança de outras neoplasias, no PDAC ocorre uma acumulação de mutações genéticas progressivas no epitélio pancreático (Figura 15) que determinam a progressão da doença bem como o seu prognóstico (7,15).

Existem vários percussores possíveis para o desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático, sendo o mais comum a neoplasia intraepitelial pancreática (NIPan), seguido da neoplasia mucinosa papilar intraductal e neoplasia mucinosa cística (15).

As principais alterações incluem a mutação de oncogenes, predominantemente do KRAS, que se encontra mutado em mais de 90% dos casos de PDAC, bem como a inativação dos genes supressores de tumor TP53, SMAD4 e p16/CDKN2A (21). Estas mutações genéticas parecem estar associadas à progressão da displasia de mínima (NIPan 1a e b) para severa (NIPan 2 e 3).

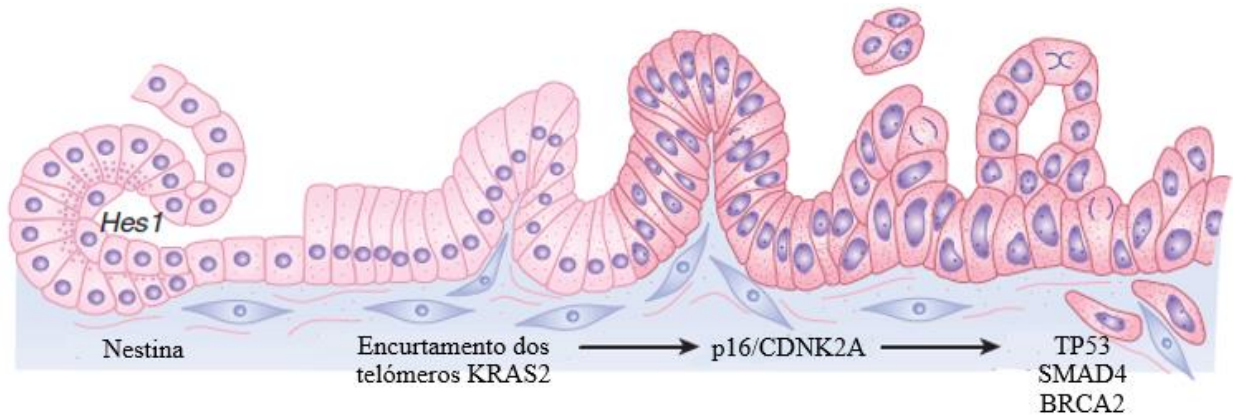


Figura 15: Progressão histológica e genética da NIPan.
Fonte: Khalili *et al.*, 2015 (6).

Como já referido anteriormente, a história familiar e os fatores genéticos contribuem para a prevalência do PDAC, sendo que entre 8% a 10% dos doentes com PDAC apresentam uma linhagem patogénica de um gene de risco. Entre os diferentes genes de risco encontram-se ATM, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, EPCAM, MLH1, MSH2 e MSH6 (1), sendo que, entre outros, ocorre a inativação dos genes MLH1 e MSH2, que controlam a reparação dos danos no DNA (13).

3. Estado de Arte do Diagnóstico do Cancro do Pâncreas

3.1. Biomarcadores

Sabe-se que uma das razões do mau prognóstico do PDAC é o seu diagnóstico ser, na maioria das vezes, tardio. Um dos fatores que leva a este problema é a ausência de biomarcadores precoces, com especificidade e sensibilidade adequadas, que possam ser detetados nas suas formas precursoras ou em estadios iniciais da doença (16,22).

Assim, tem sido realizada investigação no sentido de identificar potenciais biomarcadores que possibilitem o rastreio, diagnóstico e tratamento da doença (15).

Atualmente, realiza-se uma biopsia líquida que permite fazer a análise dos biomarcadores já caracterizados através de uma simples colheita de fluidos corporais, sendo os mais comumente utilizados o sangue, a saliva e a urina (16).

3.1.1 Biomarcadores Convencionais

3.1.1.1 Antígeno Carbohidrato 19-9 (CA19-9)

Como foi anteriormente referido, já existem vários biomarcadores descritos na literatura, contudo o CA19-9 é o único biomarcador aprovado pela agência federal de Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) (5). Contudo, este biomarcador apresenta algumas limitações.

O CA19-9 está ausente em doentes assintomáticos e em 10% a 13% dos doentes com PDAC (23), sendo que, apesar de se encontrar em elevadas concentrações nos casos de doença em estadio avançado, é dificilmente identificado em estadios mais iniciais (24). Trata-se de um biomarcador não específico, com uma sensibilidade entre os 70% e 80% e uma especificidade entre os 82% e os 90% para o PDAC (23), que pode estar presente noutras condições benignas e malignas. Assim, para além de ser detetado no PDAC, o CA19-9 pode, entre outros, surgir em casos de pancreatite, colestase ou neoplasia gástrica (24), podendo originar falsos positivos em casos de infeção, inflamação ou obstrução da via biliar (17).

Este biomarcador é um derivado sialilado do antígeno Lewis A secretado pelas células ductais pancreáticas e biliares, tanto como pelas células epiteliais exócrinas gástricas, endometriais e do cólon (5,25). Desta forma, a relação entre os antígenos do grupo sanguíneo Lewis e o CA19-9 traduz mais uma limitação deste biomarcador, uma vez que apenas doentes pertencentes aos grupos sanguíneos Le (α - β +) ou Le (α + β -) irão expressar o biomarcador. Assim, os 5% a 10% de indivíduos que apresentam o fenótipo Le (α - β -) e, conseqüentemente, não apresentam a enzima

1,4-fucosil transferase, não apresentam a capacidade de produção de epitopos para o CA19-9, limitando a sua utilidade como um biomarcador (26).

Este biomarcador pode ser um bom indicador de prognóstico antes e após a cirurgia. Para além disso permite avaliar a resposta à quimioterapia. Assim, vários estudos já demonstraram que, antes de realizar a cirurgia: quanto maior a concentração sérica de CA19-9 pior será o prognóstico (27); a diminuição da concentração de CA19-9 após a cirurgia, bem como valores inferiores a 200 U/mL, são fatores preditivos de sobrevivência (28). Em 2008, Halm *et al.* (29), demonstraram que uma diminuição da concentração de CA19-9 superior a 20% comparativamente ao valor basal, após 8 semanas de tratamento, indica um aumento da esperança média de vida do doente.

Tendo em conta as suas limitações, têm sido feitos estudos de forma a avaliar o benefício da análise concomitante do CA19-9 e de outros biomarcadores conhecidos (30–32).

Um estudo publicado por Koopmann *et al.* (2004), teve o objetivo de demonstrar a eficácia da citocina inibidora de macrófagos 1 (CIM1) como biomarcador. Neste estudo foi demonstrado que a capacidade de diagnóstico foi superior quando os dois biomarcadores foram analisados simultaneamente, em comparação com a análise isolada do CA19-9 (AUC, 0.87; intervalo de confiança 95%, 0.82-0.92; $P < 0.001$) (33).

O'Brien *et al.* (2015) reportam que, quando analisados em combinação, o CA125 conseguiu detetar os falsos positivos obtidos pela análise do CA19-9 (34). Outros estudos demonstraram que a associação do CA19-9 a outros biomarcadores aumentam o seu valor diagnóstico (35). Por exemplo, Yu-Lei *et al.* (2015) (36) verificaram que a deteção simultânea de CA19-9, CEA, CA125 e CA242 permite um diagnóstico mais sensível para o PDAC com valores de sensibilidade (90,4%) e especificidade (93,8%), maior do que qualquer um deles quando analisado isoladamente (Tabela 3).

Em 2017, Xiaohui *et al.* descobriram um conjunto de proteínas com possível relevância enquanto biomarcadores do PDAC. Assim, verificaram que a análise concomitante de 4 proteínas envolvidas no processo tumoral (APOE, APOA1, APOL1, ITIH3) e o CA19-9 permite uma deteção com sensibilidade de 95% e especificidade de 94,1% (37). Mais recentemente, Dong *et al.* estudaram de que forma a análise da periostina sérica (POSTN) e o CA242 podem complementar o estudo do CA19-9. Demonstrou-se que estes biomarcadores se encontravam em concentrações elevadas em estadios iniciais da doença, quando comparados com indivíduos do grupo controlo. A análise concomitante da POSTN, CA242 e CA19-9 permitiu uma deteção com sensibilidade e

especificidade de 92% e 97%, respetivamente, e a distinção entre indivíduos saudáveis e os indivíduos com PDAC em estadio inicial (38).

Tabela 3: Tabela resumo dos biomarcadores associados ao CA19-9 no PDAC.

Biomarcador	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Referência
CA19-9, CEA, CA125 e CA242	90,4%	93,8%	-	(36)
CA19-9, APOE, APOA1, APOL1 e ITIH3	95%	94,1%	0,99	(37)
CA19-9, POSTN e CA242	92%	97%	0,98	(38)

3.1.1.2 Outros biomarcadores convencionais

Para além do CA19-9, existem outros biomarcadores convencionais, entre eles o CEA, CA242, CA125 e DU-PAN2 (22).

Como já foi referido anteriormente, tanto a infeção como a inflamação ou obstrução biliar podem levar a concentrações séricas aumentadas de CA19-9. Já foi demonstrada uma correlação positiva entre este biomarcador e a bilirrubina, sugerindo que quando existe icterícia há uma maior probabilidade de ocorrência de falsos positivos com o CA19-9. Por outro lado, não parece haver esta relação entre a bilirrubina e os biomarcadores CEA e CA242. Desta forma, estes são os biomarcadores de preferência em doentes com icterícia (39).

No caso dos doentes com PDAC negativo para o antigénio Lewis foram estudados quais os biomarcadores com maior valor diagnóstico. Assim, nestes casos tanto o CEA como o CA125 demonstraram maior especificidade quando comparados com os restantes biomarcadores em estudo, com 98% e 93,8% respetivamente (40).

3.1.2 Metabolitos

Vários estudos demonstram que no adenocarcinoma do pâncreas existem mecanismos de comunicação entre metabolitos intratumorais, que atuam simbioticamente e possibilitam a otimização do metabolismo tumoral, bem como o seu crescimento e perpetuação (41). Assim, para além de ocorrer uma reprogramação do metabolismo energético celular, as células cancerígenas também vão estabelecer interações metabólicas com células não-malignas e com a matriz

extracelular, tal como explicado em **2.1**, envolvendo alterações enzimáticas e acumulação de metabolitos intermediários (21,41).

Desta forma, através de técnicas de medição tais como a ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectrometria de massa, é possível detetar metabolitos que funcionam como biomarcadores, entre os quais o ácido palmítico, histidina, inositol e xilitol (42).

Considerando a importância das alterações metabólicas que ocorrem no PDAC, têm sido feitos vários estudos com o objetivo de encontrar um modelo possível para o diagnóstico através de metabolitos.

Um estudo realizado por Kobayashi *et al.* (2013) estabeleceu um modelo que envolve o recurso a 4 dos 18 metabolitos solúveis em água que tinham descoberto previamente, de forma a aumentar a sua sensibilidade e especificidade, uma vez que estas não superavam os 80% quando avaliados isoladamente. Assim, o estudo propõe um modelo que utiliza xilitol, 1,5-anidro-d-glucitol, histidina e inositol, que apresenta uma sensibilidade de 86% e especificidade de 88% (43) (Tabela 4).

Já um estudo realizado por Gangi *et al.* (2016) comparou a capacidade de distinção entre indivíduos com PDAC e indivíduos do grupo controlo do CA19-9 e do ácido palmítico. No decorrer do estudo foram encontrados quatro metabolitos que demonstraram valor diagnóstico – ácido palmítico, ácido oleanólico, tauroquenodesoxicolato e D-esfingosina – sendo que o ácido palmítico demonstrou uma maior capacidade de distinção comparativamente ao CA19-9, apresentando sensibilidade e especificidade de 100% (44).

Tabela 4: Tabela resumo dos metabolitos como biomarcadores no PDAC.

Biomarcador	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Referência
Xilitol, 1,5-anidro-d-Glucitol, Histidina e Inositol	86%	88%	0,93	(43)
Ácido palmítico	100%	100%	1,00	(44)

3.1.3. DNA livre

Quando falamos de DNA livre de células (cfDNA) referimo-nos a fragmentos de DNA, geralmente de dupla cadeia, com um tempo de semivida igual ou inferior a uma hora, que se encontram na componente extracelular do sangue (6). O cfDNA pode ser libertado por células saudáveis, maioritariamente por células hematopoiéticas; contudo, em situações de neoplasia, a sua concentração encontra-se entre 4 a 40 vezes aumentada, uma vez que uma fração do cfDNA é libertada por células cancerígenas, ctDNA (45,46).

Apesar do mecanismo de libertação do cfDNA não ser conhecido, alguns estudos referem hipóteses como a necrose, apoptose ou secreção ativa de DNA. Esta hipótese explicaria o facto de a concentração de cfDNA estar aumentada em indivíduos com doenças oncológicas, uma vez que nestes casos há uma diminuição dos mecanismos apoptóticos (47).

O aumento das concentrações de cfDNA pode ocorrer não só no contexto de neoplasias, mas também noutras patologias (48). Desta forma, não será útil fazer a medição dos seus valores séricos totais. Atualmente, faz-se uma análise de mutações genéticas, alterações na metilação, perda de heterozigosidade e alterações microssatélites, que são características de diferentes subtipos de cancro (46). Assim, através de técnicas de extração de DNA e de PCR é possível detetar ctDNA em mais de 75% dos PDAC (49).

Existe cada vez mais evidência que o estudo de mutações somáticas e modulações epigenéticas no cfDNA permitem fazer o diagnóstico e monitorizar o tratamento em alguns cancros.

3.1.3.1 Mutações somáticas

Como seria de esperar, é possível encontrar várias mutações somáticas no cfDNA. As mutações mais frequentes encontram-se no KRAS e TP53, sendo também bastante frequente nos APC, SMAD4 e BRAF (49).

Uma vez que as mutações no TP53 e SMAD4 surgem em estadios mais tardios da doença, a mutação no KRAS tem sido a mais estudada (50). Estudos apontam que a mutação do KRAS poderá ser útil no diagnóstico precoce do PDAC, uma vez que se encontra presente em 95% dos casos (45). Através de um estudo realizado por Allenson *et al.* constatou-se esta mutação em 45,5% dos indivíduos com doença localizada e em 57,9% dos indivíduos com doença metastizada (51).

3.1.3.2 Modulações epigenéticas

Para além de ser uma doença com alterações genéticas, o cancro é uma doença também conhecida pelas suas alterações epigenéticas.

Os principais mecanismos da regulação epigenética são a metilação do DNA, modificações nas histonas e a regulação genética pós-transcricional feita por RNA não codificante. A metilação do DNA ocorre geralmente na posição 5' do anel citosina entre os dinucleótidos CpG, catalisada pelas DNA metiltransferases, dando origem ao silenciamento de alguns genes e regiões genómicas não codificantes (52). Sabe-se que os genes supressores de tumor são geralmente os mais afetados por estas alterações (45).

Um estudo recente de Liu et al. (2020) demonstrou que a sequenciação dos padrões de metilação permite detetar uma série de tipos de cancro, na sua forma metastizada ou não metastizada. Para além disso, permitiu detetar PDAC no estadio I com uma sensibilidade de 63%, e nos estadios III e IV com uma sensibilidade de 83% e 100%, respetivamente, com uma especificidade de 99% em qualquer um dos estadios (53).

Adicionalmente, Liggett *et al.* indicaram que a metilação do cfDNA permite fazer a diferenciação entre um quadro de PDAC e pancreatite crónica, através da análise de 17 biomarcadores, com uma sensibilidade de 91,2% e especificidade de 90,8% (54).

Assim, já foram investigadas alterações em genes envolvidos em diferentes funções celulares, que incluem, entre outras, a proliferação celular (GPAM, KLB, SST) e a apoptose (NUPRI, EEFDI) (55).

Melnikov *et al.* (2009) demonstraram que a análise combinada dos genes CCND2, SOCS1 e THBS1 seria um potencial painel de biomarcadores que permite o diagnóstico precoce, uma vez que apresenta uma sensibilidade de 76% e especificidade de 59% (56). Em 2019, estudou-se o SST como biomarcador de prognóstico de PDAC bem como a sua relação com a taxa de sobrevivência, demonstrando uma sensibilidade de 93% e especificidade de 89% (55).

Recentemente, Eissa *et al.* (2019) indicaram que a metilação dos genes ADAMTS1 e BNC1 pode ser utilizada como um biomarcador precoce do PDAC, uma vez que apresenta uma maior taxa de deteção da doença nos estadios I e II (100% e 94,4%, respetivamente) quando comparada com a taxa de deteção do CA19-9 (57,1% e 44,1%, respetivamente) (Tabela 5). Adicionalmente, demonstrou-se que ADAMTS1 apresenta uma sensibilidade de 87,2% e especificidade de 93,7%, enquanto BNC1 apresenta 64,1% e 93,7%, respetivamente. Quando analisados

concomitantemente, ADAMTS1 e BNC1 apresentam uma sensibilidade de 97% e especificidade de 92% (57).

Tabela 5: Tabela resumo de DNA livre de células como biomarcadores no PDAC.

Biomarcador	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Referência
Metilação de CCND2, CDKN1C, CDKN2B, DAPK1, ESR1, HMLH1, MGMT, MUC2, MYOD1, PGK1, PGR, RARb, RB1, SYK	91,2%	90,8%	-	(54)
CCND2, SOCS1 e THBS1	76%	59%	-	(56)
SST	93%	89%	0,89	(55)
ADAMTS1 e BNC1	87,2%	93,7%	0,95	(57)

3.1.4 Fatores inflamatórios e Fatores de crescimento

Sabe-se que a presença de mediadores pro-inflamatórios no microambiente tumoral contribui para a sua progressão (58), de tal modo que já foi demonstrado que a presença de citocinas, proteínas inflamatórias e metaloproteínases de matriz (MMPs) podem estar envolvidas no crescimento das células tumorais, bem como na sua proliferação, migração e angiogénese (9).

Assim, pondera-se a relevância de algumas citocinas e proteínas de fase aguda de inflamação no diagnóstico do PDAC, nomeadamente da proteína C reativa (PCr) e da interleucina 6 (IL-6) (9).

Em 2016 Yako *et al.* verificaram que, após 65 estudos realizados relativamente a 41 citocinas, seis delas se encontravam sistematicamente aumentadas no PDAC: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) e fator transformador de crescimento (FTC) (59). Neste estudo, concluiu-se que a análise isolada destas citocinas não apresenta valor diagnóstico (sensibilidade e especificidade inferior a 90%), contudo a análise de um conjunto de citocinas pode ser útil para distinguir o PDAC de outras doenças malignas ou ausência de doença. Ainda neste estudo foi possível observar que no PDAC existe um valor aumentado de MIC-1 (Macrophage Inhibitory Cytokine 1) (Tabela 6). Como já tinha sido estudado anteriormente, este biomarcador apresenta uma sensibilidade de 94% e especificidade de 90% (60), sendo que os seus valores

parecem estar relacionados com o estadio de progressão da doença (59). De forma a aumentar a sua especificidade, vários estudos sugerem a análise combinada de MIC-1 e CA19-9 (61).

Yoshinaga et al. (2018) estudou a relação entre ANGPTL2 (proteína associada a inflamação crónica e DM tipo 2) e o PDAC. Verificou-se que os valores desta proteína se encontram aumentados em casos de PDAC, apresentando a mesma capacidade diagnóstica que o CA19-9. Nos 20 indivíduos com doença em estudo, a ANGPTL2 demonstrou uma maior sensibilidade do que o CA19-9 (85% e 80%, respetivamente), sendo que a sensibilidade foi de 100% (Tabela 6) quando se combinaram os dois biomarcadores. Portanto, apesar da limitação inerente ao reduzido número de indivíduos em estudo, demonstrou-se que no estadio inicial da doença existe um aumento dos valores de ANGPTL2 antes da elevação dos valores dos outros fatores inflamatórios (62).

Tabela 6: Tabela resumo dos fatores inflamatórios e de crescimento como biomarcadores no PDAC.

Biomarcador	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Referência
MIC-1	94%	90%	-	(60)
ANGPTL2	85%	-	-	(62)
ANGPTL2 e CA19-9	100%	-	-	(62)

3.1.5 RNA não codificante livre

Recentemente constatou-se a alteração das concentrações de RNA no PDAC. Estas alterações têm sido observadas no RNA não codificante, RNA longo não codificante (lncRNA) e micro RNA (miRNA); e no RNA codificante, RNA mensageiro (mRNA) e RNA circular (cirRNA) (42).

3.1.5.1 Micro RNA

O miRNA é RNA endógeno não codificante, de cadeia única, com 18-22 nucleótidos que se pode encontrar sub ou sobre regulado (63,64). O miRNA expressa-se de forma específica nos diferentes tecidos e uma alteração da sua expressão num tecido pode ser um potencial indicador de doença e do seu respetivo estadio. Através da sua elevada complementaridade com o mRNA alvo, o miRNA induzirá a sua clivagem e, conseqüentemente, inibe a sua expressão genética (63). Postula-se que este é capaz de atuar como oncogene ou supressor, da mesma forma que é capaz de restaurar a expressão genética de forma a impedir o desenvolvimento do tumor (65).

Deste modo, o miRNA tem sido indicado como um biomarcador de interesse para o PDAC. Este é bastante estável no sangue (66) e pode ser detetado através de vários métodos – PCR quantitativo, hibridização *in situ*, sequenciação de próxima geração e *microarray* de miRNA (35).

Vários estudos, para além de identificarem o miR-216 como específico do pâncreas, referem que o miR-196a e o miR-217 permitem fazer a distinção entre PDAC e PC (22). Em 2006, Roldo *et al.* verificou que a expressão de miR-103 e miR-107 associado à diminuição da expressão de miR-155 estava presente nos indivíduos com PDAC, o que não acontecia nos indivíduos saudáveis (67). No ano seguinte, outro estudo observou uma sobreexpressão dos miR-21 e miR-196a2, indicando-os como preditivos de mau diagnóstico (68).

Mais recentemente, de uma lista de 42 miRNAs, um estudo verificou uma sensibilidade e especificidade de 91% e 90%, respetivamente, para um modelo que inclui simultaneamente miR-642b, miR-885-5p e miR-22; concluindo que esta combinação teria valor de diagnóstico em estadios iniciais da doença. Assim, apesar de o CA19-9 apresentar uma maior especificidade (100%), apresenta uma menor sensibilidade (73%) (69).

Em 2020, Deng *et al.*, através de um algoritmo, sugeriu um novo modelo de 8 miRNA envolvidos no PDAC (miR-139, miR-31, miR-196b, miR-221, miR-203b, miR-215, miR-144 e miR-4433b), capaz de distinguir indivíduos doentes de indivíduos saudáveis com uma sensibilidade e especificidade de 100% (70). No mesmo ano, Shams *et al.* concluíram que a combinação de miR-663a, miR-642b, miR-5100 e miR-8073 permite fazer o diagnóstico com uma sensibilidade de 98,6% e especificidade de 87,5% (71).

Desta forma, têm sido feitos vários estudos que demonstram o valor diagnóstico (72) e prognóstico (73,74) do miRNA, bem como o seu potencial enquanto alvo terapêutico nas neoplasias (75).

3.1.5.2. RNA longo não codificante

Os lncRNAs apresentam mais de 200 nucleótidos e estão limitados a alguns tipos celulares. Estes atuam na génese tumoral, uma vez que modulam as vias de transcrição e pós transcrição (76). Para além de se saber que existe uma desregulação do lncRNA no cancro (77), há cada vez maior evidência de que o lncRNA tem um papel na modulação da resposta à quimioterapia no PDAC, uma vez que atua na resistência de algumas células cancerígenas aos fármacos. Entre os lncRNAs incluem-se HOTTIP, GAS5, UCA1, HOST2, HCP5 e CASC2 (65).

Um estudo publicado em 2018 apurou a presença de 3 lncRNAs (ABHD11-AS1, LINC00176 e SNHG11) em indivíduos com PDAC. Entre estes 3, o ABHD11-AS1 demonstrou um maior valor diagnóstico, com uma sensibilidade e especificidade de 89,4% e 88,6%, respectivamente. Adicionalmente, averiguou-se que quando combinado o CA19-9 com o ABHD11-AS1, estes valores aumentavam para 98,5% e 100%, respectivamente (78) (Tabela 7). Mais recentemente verificou-se que em casos de PDAC existe uma sobreexpressão de LINC00261. Este, através da diminuição da expressão de miR-23a-3p nas células pancreáticas, para além de diminuir a viabilidade celular, aumenta a apoptose (77). Assim, este estudo indica o LINC00261 como um novo alvo terapêutico de interesse.

Por outro lado, para além do seu valor de diagnóstico, Giulietti *et al.* concluíram que alguns lncRNA envolvidos no desenvolvimento e progressão do PDAC podem estar relacionados com o seu prognóstico. Entre eles encontram-se A2M-AS1, LINC01133, LINC00675, LINC00205 e TSPOAP1-AS1 (79).

Portanto, os lncRNA têm interesse para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica do PDAC, sendo alvo de muitos estudos.

Tabela 7: Tabela resumo de RNA não codificante livre de células como biomarcadores do PDAC.

Biomarcador	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Referência
miR-642b, miR-885-5p e miR-22	91%	90%	-	(69)
miR-139, miR-31, miR-196b, miR-221, miR-203b, miR-215, miR-144 e miR-4433b	100%	100%	1,00	(70)
miR-663a, miR-642b, miR-5100, miR-8073	98,6%	87,5%	0,98	(71)
ABHD11-AS1	89,4%	88,6%	-	(78)
CA19-9 e ABHD11-AS1	98,5%	100%	-	(78)

3.1.6 Autoanticorpos

Outra forma de detetar o PDAC é tirar partido do sistema imunitário do indivíduo, uma vez que irá gerar autoanticorpos contra os antígenos associados ao tumor (AAT) (80).

Apesar dos autoanticorpos serem potenciais biomarcadores, vários estudos demonstram que 86% dos AAT, quando estudados individualmente, apresentam uma sensibilidade inferior a 50%. Contudo, curiosamente, estes marcadores apresentam tendencialmente uma elevada especificidade, sendo que mais de 85% do AAT apresenta valores superiores a 90% (81).

No caso do PDAC, já se constatou a presença de autoanticorpos contra p53, MUC1, fator recombinante Rad51 e a α -enolase fosforilada (ENOA) (82).

No PDAC, a ENOA encontra-se sobrerregulada, sendo que Tomaino *et al.* verificaram que as isoformas 1 e 2 do AAT contra ENOA se encontram presentes em mais de 62% dos indivíduos com a doença. Estas isoformas apresentam uma capacidade de distinção de indivíduos com doença de indivíduos saudáveis com uma sensibilidade e especificidade de 62% e 97%, respetivamente, quando analisados isoladamente; ou de 95,1% e 94%, respetivamente, quando analisadas simultaneamente com o CA19-9 (83). Para além do seu valor diagnóstico, Principe *et al.* (2015) identificou ENO1 na superfície das células tumorais, propondo que será um alvo terapêutico de interesse (84).

A Ezrin (EZR) é uma proteína de ligação entre vários fatores de crescimento e moléculas de adesão à actina do citoesqueleto, que se encontra aumentada em vários tipos de cancro, incluindo no PDAC. Num estudo de 2013, Capello *et al.* sugeriram que o autoanticorpo contra esta proteína surge numa fase inicial do PDAC. Deste modo, verificou-se que a combinação da análise dos anti-EZR, anti-ENOA1,2 e CA19-9 permite um diagnóstico com sensibilidade 100% e especificidade 92% (85) (Tabela 8).

Ghassem-Zadeh e colaboradores (2020) desenvolveram um *microarray* de autoantígenos com o objetivo de encontrar autoanticorpos com a capacidade distinguir o PDAC de PC e pancreatite autoimune (PA). Assim, verificaram que os autoantígenos TOR1B, RNF138, PPP1R15A, PAICS, LENG1, GPR3 e CYP3A5 permitem fazer a distinção entre estas 3 entidades nosológicas (86).

Tabela 8: Tabela resumo da associação do CA19-9 e autoanticorpos como biomarcadores do PDAC.

Biomarcador	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Referência
CA19-9 e anti-ENOA1,2	95,1%	94%	0,95	(83)
CA19-9, anti-EZR e anti-ENOA1,2	100%	92%	0,96	(85)

3.1.7 Células Tumorais em Circulação (CTC)

As CTC são células cancerígenas provenientes de tumores sólidos que se encontram no sangue periférico, formadas através de mecanismos de angiogénese induzidos pelo tumor (87). Em 2014, Hodgkinson *et al.* demonstraram a capacidade tumorigénica destas células, apoiando a hipótese de que sejam responsáveis pela origem de metástases (88). Desta forma, a sua presença indica invasão e metastização do tumor primário, apresentando um grande potencial como biomarcador de prognóstico da doença (89).

Enquanto os estudos mais antigos referiam que não existia uma diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos que apresentam ou não as CTC (90), estudos mais recentes concluíam que a presença de CTC se traduzia num pior prognóstico (91,92). Em 2016, uma meta-análise realizada por Xie *et al.* demonstrou que estas células podem ser importantes como biomarcadores de prognóstico em doentes com PDAC (93).

Estas células dão informações relativamente a variações genéticas na expressão de genes e nas proteínas citoplasmáticas (24). Contudo, a frequência de deteção de CTC varia bastante entre as amostras de sangue de acordo com os diferentes métodos de deteção. Assim, estas são detetadas principalmente pela constatação de alterações morfológicas, de mutações de genes específicos, bem como da sua expressão em proteínas através de imunofluorescência (42).

Em 2016, Gao *et al.* demonstraram que indivíduos com maiores níveis séricos de CTC apresentavam uma menor taxa de sobrevivência comparativamente a indivíduos com níveis inferiores. Neste estudo detetaram as CTC através de um método que integra o enriquecimento por extração e a hibridação *in situ* de imunocoloração-fluorescência (SE-iFISH). Estas células já foram caracterizadas como sendo nucleadas e com marcadores epiteliais e/ou hiperdiploides, mas sem CD45. Assim, através da utilização de vários biomarcadores (DAPI, CK, CEP8 e CD45) para a sua deteção, conseguiram obter uma sensibilidade e especificidade de 88% e 90%, respetivamente, para a deteção de PDAC (94) (Tabela 9).

Mais recentemente, tendo em conta as características das CTC, Wei *et al.* (2019) tentaram isolar estas células no PDAC através da vimentina que se encontra à superfície celular. Neste estudo, detetaram CTC vimentina⁺ em 76% dos indivíduos com PDAC. De forma a aumentar o seu valor diagnóstico, fizeram uma análise concomitante com o CA19-9, na qual comprovaram uma elevada precisão (AUC 0,968) e uma sensibilidade e especificidade de 91% e 97%,

respetivamente. Para a detecção das CTC utilizaram o método da imunofluorescência e como biomarcadores a vimentina, CD45 e Hoechst (95).

Tabela 9: Tabela resumo de CTC como biomarcadores do PDAC.

Biomarcador	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Referência
DAPI, CK, CEP8 e CD45 ⁻	88%	90%	0,95	(94)
CA19-9 e CTCs (Vimentina ⁺ , CD45 ⁻ , Hoechst ⁺)	91%	97%	0,97	(95)

3.1.8 Exossomas

Os exossomas são vesículas extracelulares, com uma bicamada lipídica e proteínas membranares, que contêm no seu interior DNA, mRNA, miRNA, proteínas e lípidos (Figura 16). Estas vesículas podem ser excretadas por todas as células, incluindo células cancerígenas (96).

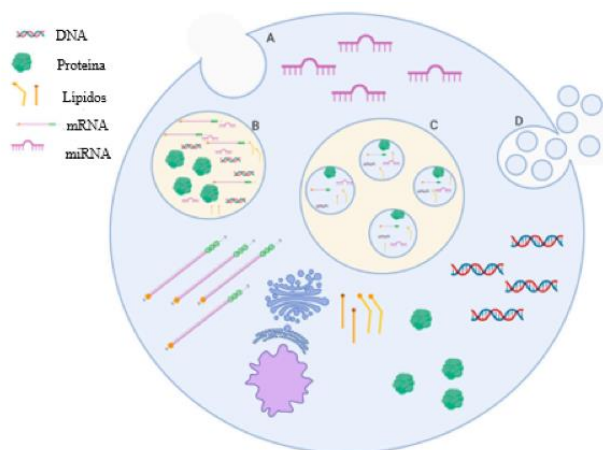


Figura 16: Biogênese dos exossomas.
Adaptada de Lane *et al.*, 2020 (96).

Assim, vários estudos têm investigado a importância dos exossomas como biomarcador de diagnóstico do PDAC, uma vez que ao estudar o seu conteúdo é possível obter informação relativa à origem do cancro, bem como as suas características genéticas e respetivo estado metabólico (97). Para além do seu conteúdo, sabe-se que a sua composição externa também varia de acordo com a sua linha celular. Desta forma, a combinação das características das VE (vesículas extracelulares) com o facto de estas se encontrarem em concentrações elevadas em quadros de doença neoplásica, torna-as um potencial biomarcador de diagnóstico interessante (96,98).

Para além do seu valor diagnóstico, também têm sido estudados como fatores de prognóstico e como alvo terapêutico direto, através da inibição da sua libertação; ou indiretos, através da alteração dos seus mecanismos de sinalização na comunicação intercelular (96). Desta forma, consegue-se inibir as vias de sinalização através das quais as VE promovem a progressão tumoral e a metastização (99).

Assim, o papel de vários elementos encontrados no interior e exterior dos exossomas tem sido alvo de vários estudos no contexto do PDAC.

Costa-Silva *et al.* (2015) propuseram que o MIF (migration inhibitory factor) exossomal apresenta um papel importante na metastização do PDAC, uma vez que tanto os seus valores plasmáticos como os valores teciduais se encontram relacionados com a agressividade da doença. Pensa-se que esta relação esteja associada à sua capacidade de induzir a libertação de TGF β e, conseqüentemente, de aumentar a produção hepática de fibronectina (FN). O depósito de FN irá levar a uma acumulação hepática de macrófagos e neutrófilos oriundos da medula óssea, levando à formação das lesões pré-metastáticas. Neste estudo, verificou-se que existe um aumento dos níveis plasmáticos de MIF exossomal em doentes com PDAC no estadio I, antes da ocorrência de metástases, indicando o seu valor de prognóstico (100).

No mesmo ano, para além de demonstrar que os exossomas derivados de células cancerígenas incluem GPC1 (glipicano-1), Melo *et al.* demonstraram que os exossomas GPC1⁺ apresentam mRNA de KRAS mutado. Neste estudo, verificou-se uma sensibilidade e especificidade de 100% através de um método de citometria de fluxo. Propõem assim que as VE GPC1⁺ em circulação podem servir como método de diagnóstico não invasivo em estadios iniciais da doença (101).

Vários estudos indicam que o miRNA que se encontra nos exossomas (exmiRNA) apresenta um papel relevante no desenvolvimento do tumor, bem como na sua metastização e resistência à quimioterapia (102). O facto de se encontrarem dentro destas vesículas faz com que os miRNAs se encontrem protegidos o que permite, desta forma, isolar e quantificar este biomarcador. Pu *et al.* demonstraram que os níveis de exmiRNA-21 e exmiRNA-10b se encontram aumentados em indivíduos com PDAC quando comparados com indivíduos saudáveis. Neste estudo, concluíram que o exmiRNA-21 pode ser considerado um biomarcador de diagnóstico precoce, uma vez que é capaz de distinguir indivíduos com doença no estadio inicial de indivíduos saudáveis. De qualquer forma, o seu valor diagnóstico é aumentado quando é estudado concomitantemente com o exmiRNA-10b (103).

3.2. Glicosilação no PDAC

Nos últimos anos, a glicobiologia tem demonstrado uma grande relevância na investigação do cancro, tendo em conta a sua função no mecanismo da doença (104).

A glicosilação é o processo enzimático através do qual um glicano se liga a outro glicano, lípido ou proteína (105). Os glicoconjugados são caracterizados tendo em conta a natureza desta ligação, sendo que estas ocorrem através de oxigénio ou nitrogénio, dando origem a O-glicanos ou N-glicanos, respetivamente. Este processo que ocorre no aparelho de Golgi e retículo endoplasmático é essencial para o controlo de vários processos fisiopatológicos, sendo que as principais alterações ocorrem em recetores que se encontram à superfície celular ou em moléculas de adesão (104,105).

As alterações na glicosilação já são estudadas há décadas, sendo que já foi descrito que ocorrem várias alterações nos padrões de glicosilação durante o desenvolvimento e progressão do cancro (106). Assim, sabe-se que os glicanos conseguem regular a angiogénese, proliferação, invasão e metastização tumoral (105). Esta glicosilação aberrante é específica e distinta para células de diferentes etiologias tumorais (104).

No PDAC, as alterações mais frequentes na glicosilação incluem o aumento da sialilação dos glicanos, alteração da fucosilação e a alteração das estruturas ramificadas dos glicanos (107).

3.2.1. Sialilação

A sialilação dos carboidratos vai modificar o seu reconhecimento celular, adesão celular e sinalização celular. No cancro, a alteração da expressão das glicosiltransferases leva a um aumento da sialilação $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$ (104).

Assim, vários estudos têm investigado o papel da glicosiltransferase ST6Gal-I na carcinogénese. Sabe-se que esta enzima adiciona ácido siálico na posição $\alpha 2,6$ das glicoproteínas (108). Num estudo de Holdbrooks *et al.* concluiu-se que, através do seu mecanismo de sialilação do TNFR1, a ST6Gal-I bloqueia seletivamente o mecanismo apoptótico do TNF. Desta forma, verificou-se que a sialilação $\alpha 2,6$ é prevalente em células cancerígenas devido à sobreexpressão de ST6Gal-I (109).

Por outro lado, o biomarcador mais utilizado na deteção do PDAC (CA19-9) apresenta na sua constituição o sialil Lewis A (sLe^A). Estudos demonstram que este se encontra em baixos níveis nos tecidos saudáveis, em níveis mais elevados em tecidos embrionários e sobre expressos em

cancros epiteliais (105). Engle *et al.*, ao estudar o impacto das alterações nos glicanos nas doenças pancreáticas, observou que a expressão de sLe^A/ CA19-9 levou a uma rápida progressão para pancreatite severa com hiper ativação da sinalização pelo recetor do fator de crescimento epitelial (RFCE). Este processo ocorre pela alteração da proteína fibulina-3, aumentando a sua interação com o RFCE (110).

Para além deste antigénio, também existem estudos referentes ao seu isómero- sialil Lewis X (sLe^X). Demonstrou-se que estes antigénios aumentam a ligação das células cancerígenas em circulação à selectina E, presente nas células epiteliais, contribuindo para a metastização (Figura 17)(111). Comprovou-se ainda que algumas proteínas implicadas na progressão do PDAC expressam o glicano sLe^X, entre elas KRAS, SPARC e Wnt7b (112).

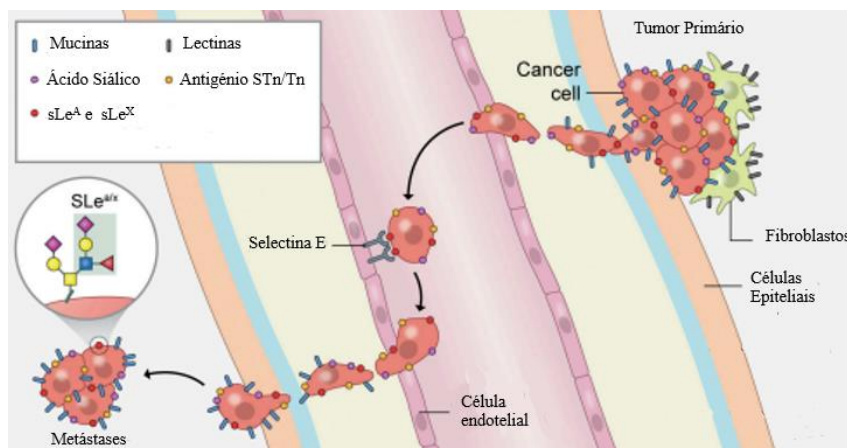


Figura 17: Papel dos antigénios sLe^A e sLe^X na metastização do PDAC.

Fonte: Lumibao *et al.*, 2022 (111) com permissão de Rockefeller University Press Journals.

Adicionalmente a estes antigénios, em doentes com PDAC também se verificaram níveis aumentados da LacNAc tipo I sialilada. Desta forma, sugere-se que a análise concomitante da LacNAc tipo I sialilada, sLe^A e sLe^X melhora o seu valor diagnóstico, apresentando uma sensibilidade e especificidade de 85% e 90%, respetivamente (113).

3.2.2. Fucosilação

A fucosilação dos glicanos ocorre através de várias fucosiltransferases, sendo que esta pode ocorrer a nível terminal (sLe) ou central (104).

O passo final da síntese dos sLe envolve a fucosilação de uma cadeia anteriormente sialilada. Assim, ocorre a fucosilação α 1,3 ou α 1,4 da cadeia do tipo 1 (sLe^A) ou tipo 2 (sLe^X) sialilada em

α 2,3 (104). Já a fucosilação central consiste na adição de uma fucose na posição α 1,6 nos resíduos LacNAc mais internos dos glicanos, pela Fuc-TVIII (FUT8) (104).

Este processo pode ser interessante para o diagnóstico do PDAC, não só porque se sabe que ocorre um aumento da fucosilação em indivíduos com a doença, mas também porque se sabe que a fucosilação de epitopos ocorre em proteínas específicas (105). Desta forma, têm sido feitos estudos que demonstram o interesse da fucosilação da haptoglobina (114) e ribonuclease 1 (RNASE1) (115) para o diagnóstico do PDAC.

3.2.3. Alterações nas ramificações

Os N-glicanos e os O-glicanos são diferentes tipos de glicanos que estabelecem ligações com as proteínas do glicoma celular de modo distinto.

N-Glicanos

São glicanos que se conjugam às proteínas pelos resíduos de asparagina de uma sequência peptídica não consensual, constituída por três péptidos Asn-X-SER/Thr, onde X pode ser qualquer AA, com exceção da prolina e, em que o terceiro AA pode ser uma serina ou treonina.

No PDAC é bastante comum ocorrer a glicosilação aberrante ligada a N, sendo que, para além da sialilação e fucosilação, as células cancerígenas apresentam níveis aumentados de N-glicanos altamente ramificados na posição β 1,6 (104,105). Estes níveis aumentados foram detetados em integrinas e proteínas de adesão envolvidas em vias de sinalização do PDAC, entre elas a sinalização pelos TGF- β , TNF e NF κ B (105).

A maioria destas ramificações ocorre pela ação da N-acetil glucosamina transferase (GnT) (116). Assim, pode verificar-se um aumento da expressão de ramificações GlcNAc nos N-glicanos pela ação da GnT-V, codificada pelo gene da manosído acetilglucosaminiltransferase 5 (MGAT5). A expressão desta enzima é regulada pela via de sinalização RAS–RAF–MAPK, que se encontra ativada no cancro (104). Assim, a sobreexpressão da MGAT5 leva a uma diminuição da adesão célula-célula e célula-matriz, aumentando a capacidade de motilidade e invasão tumoral (116). De seguida, os N-glicanos são alongados pela adição de poli-N-acetil-lactosamina (ligando das galectinas) pela β 1,3-GnTs, sendo-lhes ainda adicionado ácido siálico ou fucose. Consequentemente, forma-se um complexo galectina-glicano (104).

Para além da MGAT5, a β 1,4-N-acetil glucosamina transferase, GnT-III (MGAT3), apresenta um papel importante no PADC (104,116). Esta enzima catalisa a adição de GlcNAc ao resíduo β -manose dos N-glicanos em β 1,4 (116). Estudos mais antigos verificaram que a MGAT3 se encontra aumentada em casos de hepatocarcinogénese induzida experimentalmente, enquanto a sua atividade é dificilmente detetada em tecidos saudáveis (117). Contudo, ao contrário da MGAT5, a MGAT3 está envolvida na supressão de metástases. Desta forma, enquanto a expressão da MGAT5 se encontra aumentada apenas no tecido tumoral, a expressão da MGAT3 encontra-se aumentada no tecido tumoral e nos tecidos adjacentes (104,117).

A N-glicosilação pode ainda levar a alterações na expressão dos recetores tirosina quinase de superfície, bem como aumentar a sensibilidade das células tumorais resistentes a fármacos (105).

O-Glicanos

São glicanos em que a ligação às proteínas se faz em ambos os resíduos de serina e treonina. Adicionalmente às outras alterações, a O-glicosilação é bastante comum no PDAC. A alteração da glicosilação intracelular associada à glicosilação está intimamente relacionada com a β -N-acetil glucosamina ligada a O (O-GlcNAc) (111). Esta alteração, que se verifica em elevadas concentrações no PDAC, irá modificar a localização e atividade de enzimas metabólicas, histonas e reguladores transcricionais (Sp1, β -catenina, SOX2, FOXO3 e YAP) (118). Desta forma, vai promover a expressão de fenótipos celulares com maior capacidade proliferativa e anti-apoptótica (118).

A modificação dos O-glicanos nas células tumorais está associada à atividade relativa de enzimas como a C2GnT e α 2,3-sialil transferase I (ST3Gal-I) associadas ao cancro, cuja sobreexpressão leva à glicosilação aberrante de glicoproteínas. Sabe-se que a ST3Gal-I não é detetada em tecidos saudáveis, mas é detetada na maioria dos carcinomas, incluindo o do pâncreas. Esta enzima está associada ao crescimento tumoral, bem como à diminuição da adesão das células cancerígenas, relacionando-se com a migração e invasão destas células. Assim, a ST3Gal-I parece estar relacionada com o mau prognóstico do PDAC (104).

Uma alteração detetada com frequência no PDAC é o truncamento da N-acetilgalactosamina com ligação O- (O-GalNAc) resultando na expressão do antígeno Tn (GalNAc α 1-O-Ser/Thr) (119). Sabe-se que no pâncreas saudável não há expressão deste antígeno, contudo este está presente no PDAC e pode estar associado ao crescimento tumoral e à metastização (105). Para além

deste antigénio, o COSMC já demonstrou ser um *chaperone* molecular essencial para a O-glicosilação correta das proteínas. No PDAC, a sobreexpressão do COSMC está associada à sobreexpressão da T-sintetase, levando a um aumento da aberração dos O-glicanos. Desta forma, correlaciona-se com o aumento da migração, bem como com a capacidade anti-apoptótica e pró-metastática (119).

3.3. Detecção de biomarcadores tumorais: lectinas

Tendo em conta a aberração glicómica expressa no processo tumoral, o emprego de lectinas para a deteção de biomarcadores, maioritariamente glicoproteínas, com vista a um diagnóstico, tem sido cada vez mais explorado (120).

As lectinas são proteínas que estabelecem ligações de afinidade a hidratos de carbono, encontrando-se na natureza de forma ubíqua (120). As lectinas (121), apresentam um domínio não catalítico que se liga de forma reversível a monossacáridos e/ou oligossacáridos específicos (122).

Assim, as lectinas são capazes de mediar interações célula-célula ou hospedeiro-patógeno, o *turnover* de proteínas séricas e a resposta imunitária (121). A sua classificação pode ser feita tendo em conta:

- 1) A sua especificidade de ligação ao hidrato de carbono: Glucose/manose; Glucosamina/N-acetilglucosamina; Galactose/N-acetilgalactosamina; Fucose; Ácido siálico e de polissacáridos (123),
- 2) As suas características e número de domínios de ligação (i.e merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, superlectinas) (115) e,
- 3) As diferentes famílias de acordo com o seu *fold*ing, semelhanças estruturais e evolução genética, permitindo agrupar em 12 diferentes domínios de ligação detetados nas plantas, ou seja, possibilita agrupar as lectinas em 12 famílias (124).

A primeira lectina descoberta foi a ricina (1888), tendo sido encontrada na semente do rícino, *Ricinus communis*. Décadas mais tarde, James Sumner detetou uma proteína na *Canavalia ensiformis* e verificou que esta planta causava aglutinação de células e leveduras (120). Ainda no século XX, foi relatada a toxicidade das lectinas para os animais, já tendo sido demonstrada em vários mamíferos. Entre as lectinas encontram-se a ricina, abrina, modicina e proteínas inibidoras ribossomais (RIP). Esta citotoxicidade parece estar relacionada com a morte de células alvo pela

ação de linfócito T citotóxicos, através do reconhecimento específico destas células pelas lectinas (125).

3.3.1 Aplicação de lectinas na detecção de biomarcadores tumorais

Como já foi referido anteriormente, o estudo da alteração de glicanos, bem como a forma como estes se encontram expressos de forma aberrante, tem sido cada vez mais utilizado no diagnóstico do cancro. Desta forma, as lectinas são bastante utilizadas para a detecção de novos biomarcadores e no diagnóstico do cancro, uma vez que conseguem descodificar aberrações nos hidratos de carbono expressos nas células cancerígenas (120,125). Posto isto, as lectinas podem ser importantes na detecção do cancro quando utilizadas concomitantemente com a espetrometria de massa, uma vez que permitem detetar glicoproteínas séricas (126), que poderão ser possíveis biomarcadores etiológicos.

Contudo, para além da sua capacidade de ligação à componente glicana dos glicoconjugados, há evidências de que as lectinas estão envolvidas no mecanismo inibitório tumoral, uma vez que induzem a autofagia e apoptose (127). Para além disso, vários estudos demonstraram que, através da sua capacidade de reconhecer glicanos à superfície celular, a utilização de lectinas para a produção de nanofármacos direcionados a células tumorais do trato digestivo pode melhorar o prognóstico da doença (125). Desta forma, as lectinas apresentam valor de diagnóstico, prognóstico e terapêutico.

Para além da sua importância na investigação do PDAC, as lectinas podem ser utilizadas no estudo de doenças inflamatórias- como a DM- ou neurodegenerativas, uma vez que nestas doenças ocorrem anomalias na glicosilação e, conseqüentemente, surgem proteínas disfuncionais. Assim, as lectinas poderão detetar estas glicoproteínas disfuncionais, mesmo que estas se encontrem em baixas concentrações nos fluidos biológicos (125).

3.3.1.1. Cromatografia de afinidade com lectina imobilizada

A cromatografia de afinidade é um método que permite separar glicoproteínas, baseando-se na ligação específica entre a lectina e um carboidrato, através da utilização de uma coluna com uma matriz onde a lectina se encontra imobilizada (128) (Figura 18). Este método pode ser realizado concomitantemente com a espetrometria de massa. Assim, através da análise do eluato rico em glicoproteínas, obtido através da extração, pode comparar-se a expressão aberrante de

glicoproteínas ou alterações na glicosilação entre amostras de indivíduos saudáveis e de indivíduos com cancro (120).

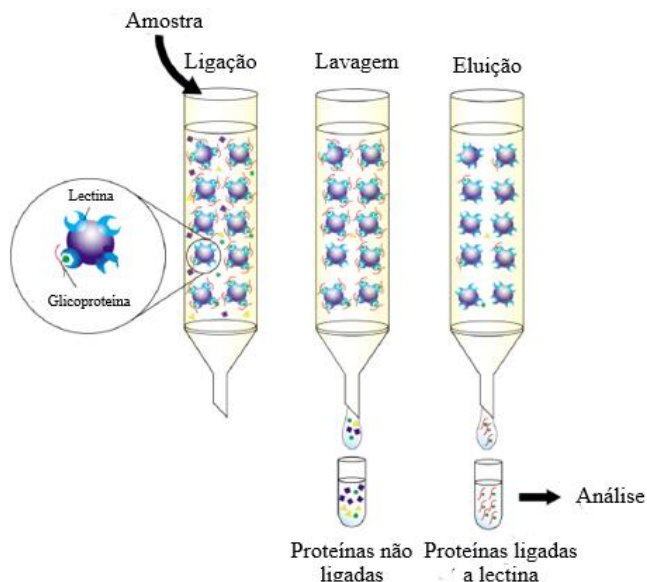


Figura 18: Cromatografia de afinidade com lectina imobilizada.

Fonte: Hashim *et al.*, 2017 (120).

Pela utilização deste método, em 2015 Tan *et al.* identificaram glicopéptidos que podem ter interesse para o diagnóstico do PDAC. Neste estudo fez-se o enriquecimento dos péptidos fucosilados do núcleo, utilizando aglutinina de *Lens culinaris* (LAC), em combinação com espetrometria de massa (129).

Devido à incapacidade de uma só lectina isolar completamente a glicoproteína, faz-se uma cromatografia de afinidade com várias lectinas, de diferentes afinidades, permitindo uma análise mais ampla e profunda (120).

3.3.1.2. Ensaio de Enzima ligada a Lectina

O ensaio de enzima ligada a lectina baseia-se no princípio do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), mas utiliza lectinas como um dos reagentes em vez de anticorpos. Neste ensaio, depois de se revestir uma amostra com glucoconjugados numa placa de microtitulação, adiciona-se um complexo de uma lectina conjugada com uma enzima. Assim, a lectina irá ligar-se ao glicano, enquanto a enzima dá coloração ao substrato, que se torna um produto corado, podendo ser quantificado através de um espectrofotómetro (120).

Este ensaio pode ser feito de três formas (Figura 19). Como se vê em (A), pode ser realizado de forma direta, ou seja, faz-se o revestimento das amostras diretamente na placa de microtitulação, sendo depois introduzido o conjugado lectina-enzima. Por outro lado, em (B) ilustra-se um ensaio híbrido, no qual a placa é revestida com um anticorpo de forma a ligar-se a proteínas específicas antes de se adicionar o conjugado lectina-enzima. Finalmente, em (C) utilizam-se duas lectinas: uma delas é utilizada como reagente, de forma a captar as glicoproteínas de interesse, enquanto a segunda lectina funciona como reagente de detecção (120).

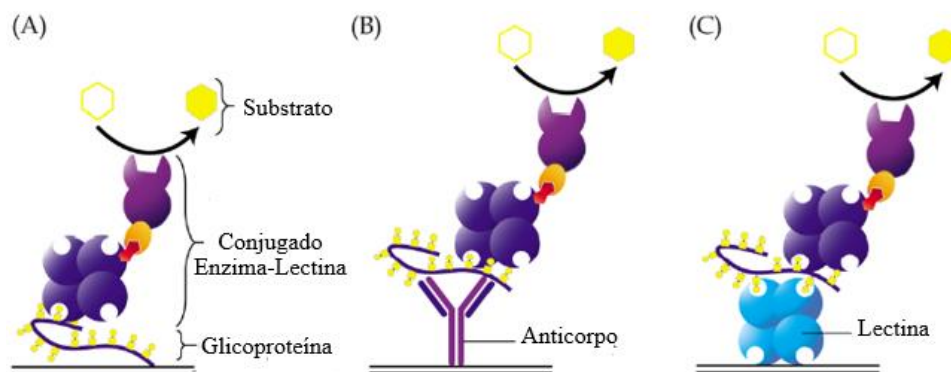


Figura 19: Possíveis ensaios de enzima ligada a lectina.

Fonte: Hashim *et al.*, 2017 (120).

Em 2018, Morishita *et al.* investigaram a importância do fenótipo da haptoglobina fucosilada (Hpt-Fuc) na detecção do PDAC, quando quantificada pelo ensaio de enzima ligada a lectina. Neste estudo, para além do método ELISA, fez-se a quantificação da Hpt-Fuc através de um ensaio que utiliza um anticorpo (glicano) da Hpt-Fuc. Os resultados mostraram que apenas os fenótipos Hpt2–1 e Hpt2–2 se encontram aumentados quando quantificados por este método. Adicionalmente, verificou-se que a combinação dos dois ensaios permite obter uma maior AUC (0.866) para o diagnóstico do PDAC (130).

3.3.1.3. Histoquímica das lectinas

A histoquímica é um método microscópico que permite observar os componentes celulares dos tecidos através das lectinas, fornecendo informação relativa aos processos de glicosilação numa amostra e a sua localização intracelular (120).

Este método pode ser aplicado de forma direta ou indireta (Figura 20). Como se vê em (A), no método direto, através da utilização de lectinas ligadas por ligação covalente a fluoróforos, enzimas, ouro ou ferritina, detetam-se as glicoproteínas presentes numa amostra de tecido. Já no método indireto, (B), esta deteção é possível através de uma lectina conjugada com um hapteno (digoxigenina ou biotina, por exemplo), que serão reconhecidas através de anti-digoxigenina ou estreptavidina ligadas a enzima, respetivamente. Sabe-se que o método indireto é mais sensível que o direto (131).

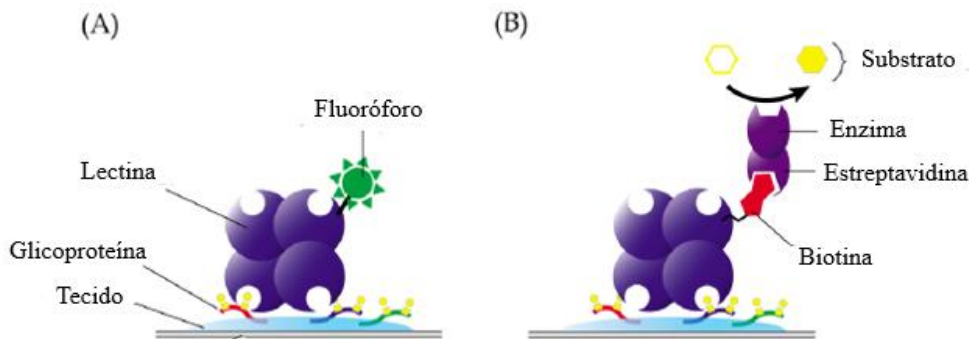


Figura 20: Técnicas utilizadas na histoquímica das lectinas. Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose, após separação por SDS-PAGE seguida da incubação com um conjugado de lectinas para deteção de glicoproteínas. Fonte: Hashim et al., 2017 (120).

Este método tem sido utilizado para o estudo de biomarcadores em diferentes tipos de cancro, entre eles o carcinoma ductal invasivo da mama (132) e do cancro colorretal (133).

3.3.1.4. *Blotting* de lectinas

O *blotting* de lectinas é uma extensão do *western blotting*, que permite a deteção de glicoproteínas pela utilização de lectinas. Assim, através da utilização de sondas de lectinas específicas para determinado glicano, faz-se a resolução da amostra por eletroforese em gel de poliacrilamida e transfere-se para membranas de nitrocelulose ou fluoreto de polivinilideno. De seguida faz-se a lavagem da membrana e a incubação com um conjugado lectina-enzima, um corante fluorescente, biotina, digoxigenina, ouro coloidal ou isótopos radioativos (Figura 21)(120).

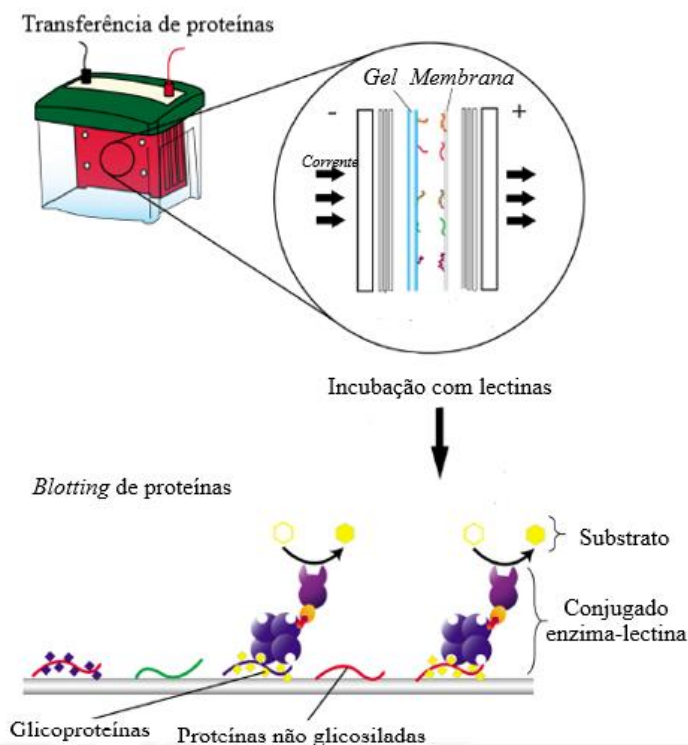


Figura 21: *Blotting* de lectinas. Resolução de amostra por eletroforese em gel de poliacrilamida e transferência para membrana de PVDF ou nitrocelulose, detetado por sondas específicas de lectina. Fonte: Hashim et al., 2017 (120).

Finalmente, faz-se a comparação entre o *blotting* dos fluidos corporais de indivíduos saudáveis e indivíduos com doença, permitindo observar a expressão das glicoproteínas.

Este método já demonstrou interesse para a detecção de glicoproteínas em diferentes tipos de cancro. Por exemplo, tem sido utilizado para estudar as características da glicosilação em diferentes linhas celulares cancerígenas, entre elas a da leucemia e de alguns tumores sólidos (134).

3.3.1.5. Array de lectinas

O *array* de lectinas permite fazer a detecção de glicanos presentes em glicolípidos ou glicoproteínas numa amostra, através de lectinas imobilizadas num suporte sólido de elevada densidade espacial (135). Ou seja, as lectinas são inseridas em diferentes pontos de uma lâmina e irão interagir com a amostra, previamente marcada com fluoróforos ou cromóforos. Desta forma, os diferentes pontos de lectinas com as glicoproteínas marcadas são detetados com recurso a um scanner apropriado (Figura 22, (A)). Por outro lado, pode-se fazer a conjugação das lectinas com uma sonda fluorescente colorida.

A forma como as lectinas se encontram dispostas na matriz permite a observação simultânea das diferentes interações, o que torna este método bastante rápido e sensível para a caracterização de carboidratos presentes em diferentes glicoproteínas (120).

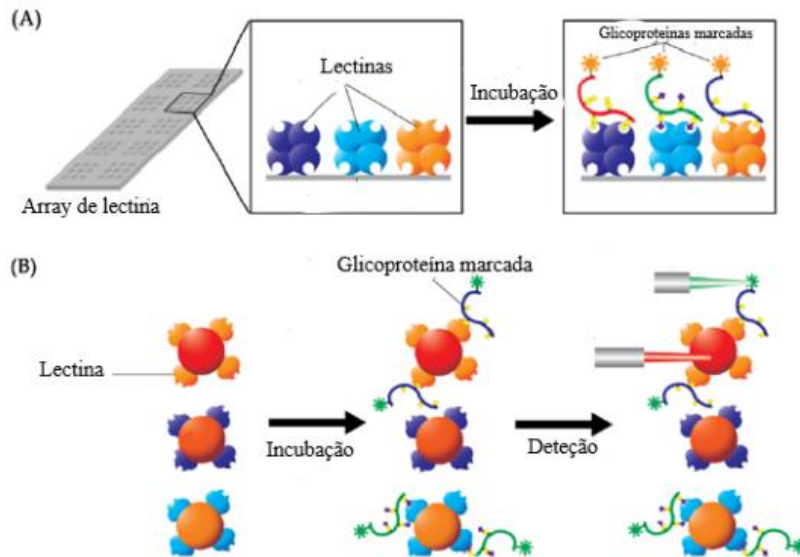


Figura 22: Array de lectinas. Interação entre lectina e amostra, com detecção da amostra marcada.
 Fonte: Hashim *et al.*, 2017 (120).

Em 2020, através de um *microarray* de lectinas Yokose *et al.* verificaram uma elevação de exossomas com O-glicanos no seu interior no soro de indivíduos com PDAC. Estes foram reconhecidos pelas lectinas ABA e ACA e demonstraram estar presentes em indivíduos sem o antígeno Lewis. Desta forma, estes exossomas ABA⁺ e ACA⁺ demonstraram ter interesse para o diagnóstico do PDAC quando estudados em combinação com o CA19-9 (136).

4. Conclusão

Apesar de todas as investigações realizadas no sentido de melhorar o seu prognóstico, o cancro do pâncreas continua a ser um dos tipos de cancro com maior mortalidade, prevendo-se que nas próximas décadas continue a afetar milhões de indivíduos. Reporta-se que a maioria dos doentes é diagnosticada num estadio avançado da doença. Assim, menos de um quinto dos doentes com cancro do pâncreas apresenta a doença localizada, passível de resseção cirúrgica. De qualquer modo, mesmo nestes casos, a taxa de sobrevivência aos 5 anos é bastante baixa (30%).

Existem vários fatores que levam ao atraso no diagnóstico. Para além dos sintomas pouco específicos da doença, não existe uma estratégia de diagnóstico padronizada. Assim, é essencial estabelecer uma estratégia de diagnóstico tanto para os indivíduos com elevado risco para o cancro do pâncreas - por história familiar ou por fatores de risco genéticos - como para a população geral.

Desta forma, adicionalmente aos métodos imagiológicos, é fundamental a deteção em amostras biológicas, por metodologias sensíveis, de biomarcadores que sejam específicos e exibam precocidade. Para além da investigação científica que tem sido feita no sentido de identificar biomarcadores que permitam detetar a doença num estadio inicial, é necessário aumentar a literacia da população para os principais sintomas inerentes, mesmo que não específicos, e fatores de risco modificáveis para o cancro do pâncreas.

Atualmente, o único biomarcador aprovado pela FDA é o antigénio carboidrato CA19-9. Contudo, este biomarcador apresenta algumas limitações quanto à sua sensibilidade e especificidade, bem como o facto de não se encontrar expresso nos 5% a 10% da população que apresenta o fenótipo Le (α - β -). Consequentemente, a associação do CA19-9 a outros biomarcadores tem demonstrado capacidade de aumentar o seu valor diagnóstico, permitindo fazer a distinção entre indivíduos com cancro do pâncreas, indivíduos com doença benigna e indivíduos saudáveis com uma elevada sensibilidade, especificidade e precisão.

Conclui-se que, apesar de todos os avanços já realizados no estudo do cancro do pâncreas, ainda existe um longo caminho a ser percorrido para se estabelecer um painel de biomarcadores devidamente validado que permita estabelecer o diagnóstico precoce da doença.

5. Perspetivas futuras

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo, sendo muitas vezes detetado num estadio avançado, quando a sintomatologia já está presente. Apesar de ser um dos maiores problemas de saúde pública, a maioria dos tipos de cancro não apresenta uma estratégia de rastreio ou diagnóstico que permita fazer a sua deteção precoce. Assim, o principal objetivo será desenvolver métodos de diagnóstico que permitam fazer esta deteção e, conseqüentemente, diminuir a mortalidade associada ao cancro.

Neste sentido, para além dos testes específicos para cada subtipo de cancro, atualmente estão em curso investigações com o objetivo de desenvolver um teste capaz de detetar vários tipos de cancro. De momento, estão a decorrer ensaios clínicos para três testes (ensaio CancerSEEK, teste Galleri e ensaio PanSeer) que demonstram uma elevada especificidade no estadio inicial do cancro, que ficarão posteriormente sujeitos a validação antes de serem aplicados no rastreio populacional.

Especificamente para o cancro do pâncreas, vários biomarcadores descobertos na última década demonstraram uma elevada sensibilidade e especificidade quando estudados concomitantemente. Assim, serão necessários mais estudos robustos de forma a obter um painel de biomarcadores capaz de fazer o diagnóstico precoce da doença, através da utilização de métodos de deteção padronizados, bem como de grupos de indivíduos de controlo, doença benigna e cancro do pâncreas com características bem definidas.

6. Referências Bibliográficas

1. Wild CP, Weiderpass E SB. World CanCer report 2020. Vol. 199, Worls Cancer Report. Cancer Research for Cancer prevention, Lyon. 2020. 512 p.
2. Jemal A, Torre L, Street W, Bray F. The Cancer Atlas - ACS. 2019. 1–69 p.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. Cell. 2000;100(7):57–70.
4. O’Neill RS, Stoita A. Biomarkers in the diagnosis of pancreatic cancer: Are we closer to finding the golden ticket? World J Gastroenterol. 2021;27(26):4045–87.
5. Miyoshi E, Morishita K, Asuka T, Fukuoka T, Takamatsu S, Kamada Y, et al. Glycan Biomarkers in Pancreatic Cancer. Compr Glycosci Second Ed. 2021;18(6):471–82.
6. Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges. Gastroenterology [Internet]. 2019;156(7):2024–40. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.259>
7. Khalili, M & Burman B. Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine. Lange - Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine. 2015. 1 p.
8. The Lancet Gastroenterology & Hepatology. Pancreatic cancer: a state of emergency? Lancet Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2021;6(2):81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30397-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30397-6)
9. Litman-Zawadzka A, Łukaszewicz-Zajęc M, Mroczko B. Novel potential biomarkers for pancreatic cancer – A systematic review. Adv Med Sci [Internet]. 2019;64(2):252–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.02.004>
10. Europe A. UEG Position Paper Bringing pancreatic cancer treatment to the 21st century : detect and treat the disease earlier and better Key figures UEG ’ s main messages Research gaps to address now to defeat pancreatic cancer. 2020;1–3.
11. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2020: Pancreatic Cancer Fact Sheet. 2020;3–4. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
12. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Diet, nutrition, physical activity and pancreatic cancer. Contin Updat Proj Expert Rep 2018 [Internet]. 2018; Available from: <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/pancreatic->

cancer-report.pdf

13. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2015;26(Supplement 5):v56–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv295>
14. United European Gastroenterology (UEG). Pancreatic Cancer Across Europe. Taking a united stand. *UEG-United Eur Gastroenterol* [Internet]. 2018;20. Available from: https://www.spg.pt/wp-content/uploads/2018/11/Pancreatic_Cancer_Report.pdf
15. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*. 2018;24(43):4846–61.
16. Moutinho-Ribeiro P, Macedo G, Melo SA. Pancreatic cancer diagnosis and management: Has the time come to prick the bubble? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(JAN):1–11.
17. Zhang L, Sanagapalli S, Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2018;24(19):2047–60.
18. P ancreatic cancer in adults : diagnosis and management. 2019;(February 2018).
19. Meslar E. Pancreatic adenocarcinoma. *JAAPA*. 2020;33(11):50–1.
20. Whatcott CJ, Posner RG, Von Hoff DD HH. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. In: *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Transworld Research Network, Trivandrum (India). Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. In: *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Transworld Research Network, Trivandrum (India). 2012.
21. Qin C, Yang G, Yang J, Ren B, Wang H, Chen G, et al. Metabolism of pancreatic cancer: Paving the way to better anticancer strategies. *Mol Cancer*. 2020;19(1):1–19.
22. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. Biomarkers for pancreatic cancer: Promising new markers and options beyond CA 19-9. *Tumor Biol*. 2013;34(6):3279–92.
23. Choi YJ, Yoon W, Lee A, Han Y, Byun Y, Kang JS, et al. Diagnostic model for pancreatic cancer using a multi-biomarker panel. *Ann Surg Treat Res*. 2021;100(3):144–53.
24. Hou J, Li XT, Xie KP. Coupled liquid biopsy and bioinformatics for pancreatic cancer early detection and precision prognostication. *Mol Cancer*. 2021;20(1):1–12.
25. Scarà S, Bottoni P, Scatena R. CA 19-9: Biochemical and clinical aspects. *Adv Exp Med*

- Biol. 2015;867:247–60.
26. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(2):105–19.
 27. Waraya M, Yamashita K, Katagiri H, Ishii K, Takahashi Y, Furuta K, et al. Preoperative serum CA19-9 and dissected peripancreatic tissue margin as determiners of long-term survival in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(5):1231–40.
 28. Ferrone CR, Finkelstein DM, Thayer SP, Muzikansky A, Fernandez-Del Castillo C, Warshaw AL. Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(18):2897–902.
 29. Hess V, Glimelius B, Grawe P, Dietrich D, Bodoky G, Ruhstaller T, et al. CA 19-9 tumour-marker response to chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer enrolled in a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2008;9(2):132–8.
 30. Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, et al. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(38):10202–7.
 31. Kaur S, Smith LM, Patel A, Menning M, Watley DC, Malik SS, et al. A Combination of MUC5AC and CA19-9 Improves the Diagnosis of Pancreatic Cancer: A Multicenter Study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2017;112(1):172–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2016.482>
 32. Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, et al. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2012;131(3):683–91.
 33. Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA, Zahurak ML, Sato N, Fukushima N, et al. Serum Macrophage Inhibitory Cytokine 1 as a Marker of Pancreatic and Other Periapillary Cancers. *Clin Cancer Res.* 2004;10(7):2386–92.
 34. O'Brien DP, Sandanayake NS, Jenkinson C, Gentry-Maharaj A, Apostolidou S, Fourkala EO, et al. Serum CA19-9 is significantly upregulated up to 2 years before diagnosis with pancreatic cancer: Implications for early disease detection. *Clin Cancer Res.* 2015;21(3):622–31.
 35. Yang J, Xu R, Wang C, Qiu J, Ren B, You L. Early screening and diagnosis strategies of pancreatic cancer: a comprehensive review. *Cancer Commun.* 2021;41(12):1257–74.

36. Gu YL, Lan C, Pei H, Yang SN, Liu YF, Xiao LL. Applicative value of serum CA19-9, CEA, CA125 and CA242 in diagnosis and prognosis for patients with pancreatic cancer treated by concurrent chemoradiotherapy. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(15):6569–73.
37. Liu X, Zheng W, Wang W, Shen H, Liu L, Lou W, et al. A new panel of pancreatic cancer biomarkers discovered using a mass spectrometry-based pipeline. *Br J Cancer* [Internet]. 2017;117(12):1846–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.365>
38. Dong D, Jia L, Zhang L, Ma N, Zhang A, Zhou Y, et al. Periostin and CA242 as potential diagnostic serum biomarkers complementing CA19.9 in detecting pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 2018;109(9):2841–51.
39. Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YF, Wu JX, Shan Y, et al. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2005;31(2):164–9.
40. Luo G, Liu C, Guo M, Cheng H, Lu Y, Jin K, et al. Potential biomarkers in lewis negative patients with pancreatic cancer. *Ann Surg.* 2017;265(4):800–5.
41. Lyssiotis CA, Kimmelman AC. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2017;27(11):863–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.06.003>
42. Al-Shaheri FN, Alhamdani MSS, Bauer AS, Giese N, Büchler MW, Hackert T, et al. Blood biomarkers for differential diagnosis and early detection of pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev.* 2021;96.
43. Kobayashi T, Nishiumi S, Ikeda A, Yoshie T, Sakai A, Matsubara A, et al. Anovel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(4):571–9.
44. Di Gangi IM, Mazza T, Fontana A, Copetti M, Fusilli C, Ippolito A, et al. Metabolomic profile in pancreatic cancer patients: A consensusbased approach to identify highly discriminating metabolites. *Oncotarget.* 2016;7(5):5815–29.
45. Jaworski JJ, Morgan RD, Sivakumar S. Circulating cell-free tumour DNA for early detection of pancreatic cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(12):1–16.
46. Gall TMH, Belete S, Khanderia E, Frampton AE, Jiao LR. Circulating Tumor Cells and Cell-Free DNA in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am J Pathol* [Internet].

- 2019;189(1):71–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.03.020>
47. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61(4):1659–65.
 48. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif* [Internet]. 2019;17(February):100087. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100087>
 49. Zill OA, Greene C, Sebisanoovic D, Siew LM, Leng J, Vu M, et al. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov.* 2015;5(10):1040–8.
 50. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol.* 2003;16(9):902–12.
 51. Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU, Bernard V, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol.* 2017;28(4):741–7.
 52. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet.* 2012;81(4):303–11.
 53. Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden M V., Liu MC, et al. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol.* 2020;31(6):745–59.
 54. Liggett T, Melnikov A, Yi QL, Replogle C, Brand R, Kaul K, et al. Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis. *Cancer.* 2010;116(7):1674–80.
 55. Manoochehri M, Wu Y, Giese NA, Strobel O, Kutschmann S, Haller F, et al. SST gene hypermethylation acts as a pan-cancer marker for pancreatic ductal adenocarcinoma and multiple other tumors: toward its use for blood-based diagnosis. *Mol Oncol.* 2020;14(6):1252–67.
 56. Melnikov AA, Scholtens D, Talamonti MS, Bentrem DJ, Levenson V V. Methylation profile of circulating plasma DNA in patients with pancreatic cancer. *J Surg Oncol.* 2009;99(2):119–22.
 57. Eissa MAL, Lerner L, Abdelfatah E, Shankar N, Canner JK, Hasan NM, et al. Promoter

- methylation of ADAMTS1 and BNC1 as potential biomarkers for early detection of pancreatic cancer in blood. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):1–10.
58. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436–44.
 59. Yako YY, Kruger D, Smith M, Brand M. Cytokines as biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: A systematic review. *PLoS One*. 2016;11(5):1–33.
 60. Kaur S, Chakraborty S, Baine MJ, Mallya K, Smith LM, Sasson A, et al. Potentials of Plasma NGAL and MIC-1 as Biomarker(s) in the Diagnosis of Lethal Pancreatic Cancer. *PLoS One*. 2013;8(2).
 61. Wang X, Li Y, Tian H, Qi J, Li M, Fu C, et al. Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a novel diagnostic serum biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14(1):1–11.
 62. Yoshinaga T, Niou T, Niihara T, Kajiya Y, Hori E, Tomiyoshi A, et al. Angiopoietin-like protein 2 is a useful biomarker for pancreatic cancer that is associated with type 2 diabetes mellitus and inflammation. *J Cancer*. 2018;9(24):4736–41.
 63. Tang S, Bonaroti J, Unlu S, Liang X, Tang D, Zeh HJ, et al. Sweating the small stuff: MicroRNAs and genetic changes define pancreatic cancer. *Pancreas*. 2013;42(5):740–59.
 64. Humeau M, Torrisani JÔ, Cordelier P. MiRNA in clinical practice: Pancreatic cancer. *Clin Biochem* [Internet]. 2013;46(10–11):933–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.03.019>
 65. Smolarz B, Durczyński A, Romanowicz H, Hogendorf P. The role of microrna in pancreatic cancer. *Biomedicines*. 2021;9(10):1–26.
 66. Bauer AS, Keller A, Costello E, Greenhalf W, Bier M, Borries A, et al. Diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis by measurement of microRNA abundance in blood and tissue. *PLoS One*. 2012;7(4):3–8.
 67. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*. 2006;24(29):4677–84.
 68. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *J Am Med Assoc*. 2007;297(17):1901–8.

69. Ganepola GA, Rutledge JR, Suman P, Yiengpruksawan A, Chang DH. Novel Blood-Based MicroRNA Biomarker Panel for Early Diagnosis of Pancreatic Cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2014;6(1):22–33.
70. Deng B, Wang M, Liu Z. A panel of 8 miRNAs as a novel diagnostic biomarker in pancreatic cancer. *Med (United States)*. 2020;99(38).
71. Shams R, Saberi S, Zali M, Sadeghi A, Ghafouri-Fard S, Aghdai HA. Identification of potential microRNA panels for pancreatic cancer diagnosis using microarray datasets and bioinformatics methods. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–15.
72. Itani MM, Nassar FJ, Tfayli AH, Talhouk RS, Chamandi GK, Itani ARS, et al. A signature of four circulating micrnas as potential biomarkers for diagnosing early-stage breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):1–15.
73. Tesfaye AA, Azmi AS, Philip PA. miRNA and Gene Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am J Pathol* [Internet]. 2019;189(1):58–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.10.005>
74. Shivapurkar N, Mikhail S, Navarro R, Bai W, Marshall J, Hwang J, et al. Decrease in blood miR-296 predicts chemotherapy resistance and poor clinical outcome in patients receiving systemic chemotherapy for metastatic colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28(6):887.
75. Saberinia A, Alinezhad A, Jafari F, Soltany S, Akhavan Sigari R. Oncogenic miRNAs and target therapies in colorectal cancer. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020;508(May):77–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.05.012>
76. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016;17(1):47–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2015.10>
77. Wang X, Gao X, Tian J, Zhang R, Qiao Y, Hua X, et al. LINC00261 inhibits progression of pancreatic cancer by down-regulating miR-23a-3p. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2020;689:108469. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108469>
78. Liu Y, Feng W, Liu W, Kong X, Li L, He J, et al. Circulating lncRNA ABHD11-AS1 serves as a biomarker for early pancreatic cancer diagnosis. *J Cancer*. 2019;10(16):3746–56.
79. Giulietti M, Righetti A, Principato G, Piva F. LncRNA co-expression network analysis reveals novel biomarkers for pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2018;39(8):1016–25.
80. Zaenker P, Ziman MR. Serologic autoantibodies as diagnostic cancer biomarkers - A

- review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22(12):2161–81.
81. Dumstrei K, Chen H, Brenner H. A systematic review of serum autoantibodies as biomarkers for pancreatic cancer detection. *Oncotarget.* 2016;7(10):11151–64.
 82. Rezaei M, Nikeghbalian S, Mojtahedi Z, Ghaderi A. Identification of antibody reactive proteins in pancreatic cancer using 2D immunoblotting and mass spectrometry. *Oncol Rep.* 2018;39(5):2413–21.
 83. Tomaino B, Cappello P, Capello M, Fredolini C, Sperduti I, Migliorini P, et al. Circulating autoantibodies to phosphorylated α -enolase are a hallmark of pancreatic cancer. *J Proteome Res.* 2011;10(1):105–12.
 84. Principe M, Ceruti P, Shih NY, Chattaragada MS, Rolla S, Conti L, et al. Targeting of surface alpha-enolase inhibits the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(13):11098–113.
 85. Capello M, Cappello P, Linty FC, Chiarle R, Sperduti I, Novarino A, et al. Autoantibodies to Ezrin are an early sign of pancreatic cancer in humans and in genetically engineered mouse models. *J Hematol Oncol.* 2013;6(1).
 86. Ghassem-Zadeh S, Hufnagel K, Bauer A, Frossard JL, Yoshida M, Kutsumi H, et al. Novel autoantibody signatures in sera of patients with pancreatic cancer, chronic pancreatitis and autoimmune pancreatitis: A protein microarray profiling approach. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7).
 87. Brunt R. Points of view. *Points of View, The Lancet.* 2005;(Kelynack 1898):60–74.
 88. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, Metcalf RL, Rothwell DG, Trapani F, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med.* 2014;20(8):897–903.
 89. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene [Internet].* 2016;35(10):1216–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2015.192>
 90. Uchikura K, Takao S, Nakajo A, Miyazono F, Nakashima S, Tokuda K, et al. Intraoperative molecular detection of circulating tumor cells by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with biliary-pancreatic cancer is associated with hematogenous metastasis. *Ann Surg Oncol.* 2002;9(4):364–70.
 91. Bidard FC, Huguet F, Louvet C, Mineur L, Bouché O, Chibaudel B, et al. Circulating tumor cells in locally advanced pancreatic adenocarcinoma: The ancillary CirCe 07 study to the

- LAP 07 trial. *Ann Oncol* [Internet]. 2013;24(8):2057–61. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt176>
92. De Albuquerque A, Kubisch I, Breier G, Stamminger G, Fersis N, Eichler A, et al. Multimarker gene analysis of circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: A feasibility study. *Oncology*. 2012;82(1):3–10.
 93. Zhi-Bo Xie, Lie Yao, Chen Jin D-LF. Circulating Tumor Cells in Pancreatic Cancer Patients: Efficacy in Diagnosis and Value in Prognosis. *Circulating Tumor Cells in Pancreatic Cancer Patients: Efficacy in Diagnosis and Value in Prognosis*. 2016.
 94. Gao Y, Zhu Y, Zhang Z, Zhang C, Huang X, Yuan Z. Clinical significance of pancreatic circulating tumor cells using combined negative enrichment and immunostaining-fluorescence in situ hybridization. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2016;35(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-016-0340-0>
 95. Wei T, Zhang X, Zhang Q, Yang J, Chen Q, Wang J, et al. Vimentin-positive circulating tumor cells as a biomarker for diagnosis and treatment monitoring in patients with pancreatic cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2019;452(December 2018):237–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.009>
 96. Lane JS, Von Hoff D, Cridebring D, Goel A. Extracellular vesicles in diagnosis and treatment of pancreatic cancer: Current state and future perspectives. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1–18.
 97. Fonseca P, Vardaki I, Occhionero A, Panaretakis T. Metabolic and Signaling Functions of Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicles [Internet]. Vol. 326, *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc.; 2016. 175–199 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.04.004>
 98. Brinton LT, Sloane HS, Kester M, Kelly KA. Formation and role of exosomes in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(4):659–71.
 99. Batista IA, Melo SA. Exosomes and the future of immunotherapy in pancreatic cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
 100. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*. 2015;17(6):816–26.
 101. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. Glypican-1

- identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523(7559):177–82.
102. Wang L, Zhao F, Xiao Z, Yao L. Exosomal microRNA-205 is involved in proliferation, migration, invasion, and apoptosis of ovarian cancer cells via regulating VEGFA. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2019;19(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0990-z>
 103. Pu X, Ding G, Wu M, Zhou S, Jia S, Cao L. Elevated expression of exosomal microRNA–21 as a potential biomarker for the early diagnosis of pancreatic cancer using a tethered cationic lipoplex nanoparticle biochip. *Oncol Lett*. 2020;19(3):2062–70.
 104. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015;15(9):540–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3982>
 105. Munkley J. The glycosylation landscape of pancreatic cancer (Review). *Oncol Lett*. 2019;17(3):2569–75.
 106. Gupta R, Leon F, Thompson CM, Nimmakayala R, Karmakar S, Nallasamy P, et al. Global analysis of human glycosyltransferases reveals novel targets for pancreatic cancer pathogenesis. *Br J Cancer* [Internet]. 2020;122(11):1661–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-020-0772-3>
 107. Qorri B, Harless W, Szewczuk MR. Novel molecular mechanism of aspirin and celecoxib targeting Mammalian neuraminidase-1 impedes epidermal growth factor receptor signaling axis and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:4149–67.
 108. Schultz MJ, Holdbrooks AT, Chakraborty A, Grizzle WE, Landen CN, Buchsbaum DJ, et al. The tumor-associated glycosyltransferase ST6Gal-I regulates stem cell transcription factors and confers a cancer stem cell phenotype. *Cancer Res*. 2016;76(13):3978–88.
 109. Holdbrooks AT, Britain CM, Bellis SL. ST6Gal-I sialyltransferase promotes tumor necrosis factor (TNF)-mediated cancer cell survival via sialylation of the TNF receptor 1 (TNFR1) death receptor. *J Biol Chem*. 2018;293(5):1610–22.
 110. Engle DD, Tiriach H, Rivera KD, Pommier A, Whalen S, Oni TE, et al. The glycan CA19-9 promotes pancreatitis and pancreatic cancer in mice. *Science* (80-). 2019;364(6446):1156–62.

111. Lumibao JC, Tremblay JR, Hsu J, Engle DD. Altered glycosylation in pancreatic cancer and beyond. *J Exp Med* [Internet]. 2022;219(6):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35522218><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC9086500>
112. Rho J hyun, Mead JR, Wright WS, Brenner DE, Stave JW, Gildersleeve JC, et al. Discovery of sialyl Lewis A and Lewis X modified protein cancer biomarkers using high density antibody arrays. *J Proteomics* [Internet]. 2014;96:291–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.030>
113. Tang H, Partyka K, Hsueh P, Sinha JY, Kletter D, Zeh H, et al. Glycans Related to the CA19-9 Antigen Are Increased in Distinct Subsets of Pancreatic Cancers and Improve Diagnostic Accuracy Over CA19-9. *Cmgh* [Internet]. 2016;2(2):210-221.e15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.12.003>
114. Kamada Y, Kinoshita N, Tsuchiya Y, Kobayashi K, Fujii H, Terao N, et al. Reevaluation of a lectin antibody ELISA kit for measuring fucosylated haptoglobin in various conditions. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2013;417:48–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.12.014>
115. Barrabés S, Pagès-Pons L, Radcliffe CM, Tabarés G, Fort E, Royle L, et al. Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer. *Glycobiology*. 2007;17(4):388–400.
116. Taniguchi N, Kizuka Y. Glycans and cancer: Role of N-Glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics [Internet]. 1st ed. Vol. 126, *Advances in Cancer Research*. Elsevier Inc.; 2015. 11–51 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2014.11.001>
117. Miyoshi E, Nishikawa A, Ihara Y, Gu J, Sugiyama T, Taniguchi N, et al. N-Acetylglucosaminyltransferase III and V Messenger RNA Levels in LEC Rats during Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 1993;53(17):3899–902.
118. Nagel AK, Ball LE. Intracellular protein O-GlcNAc modification integrates nutrient status with transcriptional and metabolic regulation [Internet]. 1st ed. Vol. 126, *Advances in Cancer Research*. Elsevier Inc.; 2015. 137–166 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2014.12.003>
119. Hofmann BT, Schlüter L, Lange P, Mercanoglu B, Ewald F, Fölster A, et al. COSMC

- knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2015;14(1):1–15. Available from: ???
120. Hashim OH, Jayapalan JJ, Lee CS. Lectins: An effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ*. 2017;2017(9):1–30.
 121. Sharon N, Lis H. Lectins. *Encycl Biol Chem Second Ed*. 2013;(October):701–5.
 122. Lam SK, Ng TB. Lectins: Production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89(1):45–55.
 123. Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev*. 1998;98(2):637–74.
 124. Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. Chapter 3 Plant Lectins. *Adv Bot Res*. 2008;48(08):107–209.
 125. Ribeiro AC, Ferreira R, Freitas R. Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications [Internet]. 1st ed. Vol. 58, *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B.V.; 2018. 1–42 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00001-5>
 126. Drake RR, Schwegler EE, Malik G, Diaz J, Block T, Mehta A, et al. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(10):1957–67.
 127. Bhutia SK, Panda PK, Sinha N, Praharaj PP, Bhol CS, Panigrahi DP, et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. *Pharmacol Res* [Internet]. 2019;144(April):8–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.001>
 128. Hage DS, Anguizola JA, Bi C, Li R, Matsuda R, Papastavros E, et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2012;69:93–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.004>
 129. Tan Z, Yin H, Nie S, Lin Z, Zhu J, Ruffin MT, et al. Large-scale identification of core-fucosylated glycopeptide sites in pancreatic cancer serum using mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2015;14(4):1968–78.
 130. Morishita K, Ito N, Koda S, Maeda M, Nakayama K, Yoshida K, et al. Haptoglobin phenotype is a critical factor in the use of fucosylated haptoglobin for pancreatic cancer diagnosis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2018;487(July):84–9. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.09.001>

131. Roth J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochem Cell Biol.* 2011;136(2):117–30.
132. Dos-Santos PB, Zanetti JS, Vieira-de-Mello GS, Rêgo MBM, Alfredo Ribeiro-Silva A, Beltrão EIC. Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: A clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(5):2337–49.
133. Hägerbäumer P, Vieth M, Anders M, Schumacher U. Lectin histochemistry shows WGA, PHA-L and HPA binding increases during progression of human colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2015;35(10):5333–40.
134. Li N, Dong G, Wang S, Zhu S, Shen Y, Li G. Pinellia pedatisecta agglutinin-based lectin blot analysis distinguishes between glycosylation patterns in various cancer cell lines. *Oncol Lett.* 2014;8(2):837–40.
135. Hirabayashi J, Kuno A, Tateno H. Lectin-based structural glycomics: A practical approach to complex glycans. *Electrophoresis.* 2011;32(10):1118–28.
136. Yokose T, Kabe Y, Matsuda A, Kitago M. O -Glycan-Altered Extracellular Vesicles : A Specific Serum Marker Elevated in Pancreatic Cancer. 2020;(July):1–17.

Anexos

A1. Critérios de Classificação do PDAC

Resectability status	Arterial	Venous
Resectable	No arterial tumour contact [coeliac axis (CA), superior mesenteric artery (SMA), or common hepatic artery (CHA)]	No tumour contact with the superior mesenteric vein (SMV), or portal vein (PV) or <math><180^\circ</math> contact without vein contour irregularity
Borderline resectable	<p>Pancreatic head/uncinate process</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solid tumour with CHA without extension to coeliac axis or hepatic artery bifurcation allowing for safe and complete resection and reconstruction • Solid tumour contact with the SMA <math>\leq 180^\circ</math> • Presence of variant arterial anatomy (e.g. accessory right hepatic artery) and the presence and degree of tumour contact should be noted if present as it may affect surgical planning <p>Pancreatic body/tail</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solid tumour contact with the CA of <math>\leq 180^\circ</math> • Solid tumour contact with the CA of <math>>180^\circ</math> without involvement of the aorta and with intact and uninvolved gastroduodenal artery (some members prefer these criteria to be in the unresectable category) 	<ul style="list-style-type: none"> • Solid tumour contact with the SMV or PV of <math>>180^\circ</math>, contact of <math>\leq 180^\circ</math> with contour irregularity of the vein or thrombosis of the vein but with suitable vessels proximal and distal to the site of involvement allowing for safe and complete resection and vein reconstruction • Solid tumour contact with the inferior vena cava (IVC)
Unresectable	<ul style="list-style-type: none"> • Distant metastases <p>Pancreatic head/uncinate process</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solid tumour contact with SMA <math>>180^\circ</math> • Solid tumour contact with the CA <math>>180^\circ</math> • Solid tumour contact with the first jejunal SMA branch <p>Body and tail</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solid tumour contact with the SMA and CA • Solid tumour contact with the CA and aorta 	<p>Pancreatic head/uncinate process</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unreconstructible SMV/PV due to tumour involvement or occlusion (can be due to tumour or bland thrombus) • Contact with most proximal draining jejunal branch into SMV <p>Body and tail</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unreconstructible SMV/PV due to tumour involvement or occlusion (can be due to tumour or bland thrombus)

Tabela retirada de ESMO guidelines (13).

A2. Regime Terapêutico para doença localizada em estadio avançado

	Preferred Regimens	Other Recommended Regimens	Useful in Certain Circumstances
Good PS	<ul style="list-style-type: none"> • FOLFIRINOX (category 1) or modified FOLFIRINOX^{e,f,6} • Gemcitabine + albumin-bound paclitaxel^{f,7} (category 1) <p>Only for known BRCA1/2 or PALB2 mutations:</p> <ul style="list-style-type: none"> • FOLFIRINOX (category 1) or modified FOLFIRINOX^{e,f,6} • Gemcitabine + cisplatin¹⁰ 	<ul style="list-style-type: none"> • Gemcitabine + erlotinib^{9,8} (category 1) • Gemcitabine (category 1) • Gemcitabine + capecitabine⁹ • Fixed-dose-rate gemcitabine, docetaxel, capecitabine (GTX regimen)¹¹ (category 2B) • Fluoropyrimidine + oxaliplatin (eg, 5-FU + leucovorin + oxaliplatin [OFF]¹² or CapeOx¹³) (category 2B) 	<ul style="list-style-type: none"> • None
Poor PS	<ul style="list-style-type: none"> • Gemcitabine <ul style="list-style-type: none"> ▶ 1000 mg/m² over 30 minutes, weekly for 3 weeks every 28 days (category 1) ▶ Fixed-dose-rate gemcitabine (10 mg/m²/min) may substitute for standard infusion of gemcitabine over 30 minutes (category 2B) • Capecitabine (category 2B) • Continuous infusion 5-FU (category 2B) 	<ul style="list-style-type: none"> • None 	<ul style="list-style-type: none"> • Pembrolizumab^{i,16} (only for MSI-H or dMMR tumors) • Larotrectinib (if NTRK gene fusion positive) • Entrectinib (if NTRK gene fusion positive) (category 2B)

Tabela retirada de guidelines NCCN (19).

A3. Regime Terapêutico de Manutenção

Preferred Regimens	Other Recommended Regimens	Useful in Certain Circumstances
<ul style="list-style-type: none"> • If previous platinum-based chemotherapy: <ul style="list-style-type: none"> ▸ Olaparib (only for germline <i>BRCA1/2</i> mutations) 	<ul style="list-style-type: none"> • Clinical trial or • If previous first-line FOLFIRINOX: <ul style="list-style-type: none"> ▸ Capecitabine or • If previous first-line gemcitabine + nab-paclitaxel: <ul style="list-style-type: none"> ▸ Gemcitabine + nab-paclitaxel modified schedule (category 2B) ▸ Gemcitabine single agent (category 2B) 	<ul style="list-style-type: none"> • If previous first-line FOLFIRINOX: <ul style="list-style-type: none"> ▸ 5-FU ± irinotecan^k ▸ FOLFOX^l (category 2B)

Tabela retirada de guidelines NCCN (19).

A4. Variantes morfológicas do PDAC

Table 4 Summary of the different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma^[52]

Morphological Variant	Characteristics
Adenosquamous carcinoma	Significant components of ductal/glandular and squamous differentiation (at least 30%). Considered to have a worse prognosis than pancreatic adenocarcinoma.
Colloid/mucinous carcinoma	Production of copious amounts of extracellular stromal mucin. Most arise in association with intraductal papillary mucinous neoplasms; thought to have more favourable prognosis than pancreatic adenocarcinoma
Undifferentiated/anaplastic carcinoma	Minimal or no differentiation; highly atypical cells which may appear spindle shaped or sarcomatoid, often admixed with osteoclast-like giant cells. One of the most aggressive forms of pancreatic cancer with extremely poor survival rates
Signet ring cell carcinoma	Discohesive, singly invasive cells with intracytoplasmic mucin that may displace the nucleus. Similar tumours throughout the gastrointestinal tract. Very rare form of pancreatic cancer with prognosis similar to that of pancreatic adenocarcinoma
Medullary carcinoma	Syncytial arrangement of pleomorphic epithelial cells with associated intratumoral lymphoid infiltrate. Prognosis is slightly better than pancreatic adenocarcinoma
Hepatoid carcinoma	Morphological similarity to hepatocellular carcinoma. May produce bile. Very rare tumour with a poor prognosis similar to that of pancreatic adenocarcinoma

Tabela retirada de (15).