

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES
EM TUMORES DO PÂNCREAS E REGIÃO PERIAMPULAR**

Tese submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Doutora em Genética e
Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patricia Ashton-Prolla
Porto Alegre, janeiro de 2020.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi primordialmente executado no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Laboratório de Carcinogênese Molecular (Instituto Nacional de Câncer, RJ, Brasil). Para o desenvolvimento dos conhecimentos acerca de alterações epigenéticas houve importante contribuição do Dr Zdenko Herceg e de membros de seu laboratório na Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) em Lyon, França. Tivemos como fontes financiadoras o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS, a Pró-reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da UFRGS e Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Vera Lúcia Gregório Silva
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Professora Patricia Ashton Prolla, pela orientação durante todas as etapas da minha vida acadêmica (graduação, mestrado e doutorado). Obrigada pelo enorme aprendizado e oportunidade. Sua postura é um exemplo a ser seguido na carreira científica.

À Bárbara Alemar, pelas parcerias estabelecidas, orientação inestimável que me conduziu a um grande amadurecimento acadêmico. Agradeço pela amizade, que se tornou essencial na minha vida pessoal.

Ao Professor Alessandro Osvaldt, pela grande colaboração no desenvolvimento do estudo, suporte e incentivo. Sou muito grata por ter convivido com um médico tão empenhado em tentar modificar o triste cenário das neoplasias pancreáticas.

À Professora Raquel Riveiro e Dra Simone Machado pelo ensinamento aprofundado sobre a patologia dos tumores pancreáticos e periampulares. Obrigada pela grande confiança e amizade, vocês foram peças chave nesse trabalho.

À Ivaine Sauthier, pela grande colaboração no projeto, parcerias estabelecidas e amizade. Agradeço também à Yasminne Rocha, pela atuação exemplar como aluna de iniciação científica.

Ao Professor Luis Felipe Ribeiro Pinto e a Professora Sheila Coelho, pela oportunidade de colaboração desenvolvida neste trabalho. Obrigada pelo acolhimento no Instituto Nacional de Câncer e grandes discussões.

Ao Professor Dr. Zdenko Herceg, pela receptividade em seu grupo de pesquisas em Lyon, e pelo conhecimento compartilhado. Ao Dr. Fazlur Talukdar, pelo suporte ao trabalho desenvolvido, estímulo, discussões científicas. À Athena Sklias, muito obrigada pela amizade e por me apoiar em uma fase tão difícil.

Ao Igor Araujo, Tiago Finger Andreis, Clévia Rosset e Nataniel Ludwig pela grande ajuda na etapa final deste trabalho. Agradeço também a todos os integrantes do Laboratório de Medicina Genômica, pelo carinho, apoio e amizade.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, Patrícia Koehler e Jeferson Becker, Marina Siebert e Everaldo Almeida pelo suporte e atenção.

À todos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), pela excelência e profissionalismo. Em especial ao Elmo Cardoso, que sempre esteve disposto a auxiliar a resolver as pendências que surgiram ao longo do doutorado.

Ao meu namorado, Leonardo Chicaybam, por me apoiar tanto na reta final desse trabalho. Obrigada pelo amor e grande suporte emocional. Também agradeço pela inestimável ajuda na revisão do meu trabalho.

À minha família, por sempre acreditar na minha capacidade e apoiar minhas escolhas. Ao meu pai, Juarez Marques, pelo suporte incondicional, e por entender minha ausência tantas vezes. À minha irmã, Aline Gregório, por nunca ter me deixado desistir quando as adversidades apareceram, e por me mostrar constantemente o meu crescimento como profissional. Agradeço também à minha avó, Adelina Palhano, pelo amor, preocupação e ser um grande exemplo de mulher. Por fim, agradeço minha mãe, Vera Lúcia Gregório Silva (*in memoriam*), que a partir do momento que me formei em Biomedicina passou a me chamar de Doutora. Perder você durante essa jornada foi um dos desafios mais difíceis que enfrentei. Obrigada por repetir tantas vezes (- *minha Doutora*). Hoje terei o orgulho de dizer que sim mãe, finalmente sou sua Doutora.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	17
1. Câncer e epidemiologia do câncer de pâncreas	18
1.1. Fatores de risco para câncer de pâncreas	18
1.2. Classificação histopatológica dos tumores do pâncreas	24
1.2.1. Adenocarcinoma ductal pancreático	24
1.2.1.1. <i>Diagnóstico, agressividade e tratamento do adenocarcinoma ductal pancreático</i>	25
1.2.1.2. <i>Biologia molecular do adenocarcinoma ductal pancreático</i>	27
2. Região periampular e carcinomas periampulares	30
2.1. Carcinoma periampular originado do pâncreas	32
2.2. Carcinoma periampular originado da ampola de Vater.....	33
2.2.1. <i>Etiologia dos carcinomas de ampola de Vater</i>	34
2.2.2. <i>Alterações moleculares dos carcinomas de ampola de Vater</i>	34
2.3. Carcinoma periampular originado do ducto biliar distal	35
2.4. Carcinoma periampular originado do duodeno	36
3. Epigenética	37
3.1. Metilação do DNA.....	37
3.1.1. <i>Metilação do DNA em carcinomas periampulares</i>	40
3.2. Modificações nas Histonas	42
3.2.1. <i>Desacetilases de histonas em carcinomas periampulares</i>	46
CAPÍTULO II: JUSTIFICATIVA	49
CAPÍTULO III: OBJETIVOS	51
CAPÍTULO IV: Manuscrito 1	
“Pancreatic Ductal Adenocarcinoma methylome analysis identifies differentially methylated genes in the Calcium signaling pathway and early methylation alterations”	53
CAPÍTULO V: Manuscrito 2	
“Histone deacetylase expression profile in periampullary carcinomas: a preliminary study based on public datasets and clinical samples”	110

CAPÍTULO VI: Manuscrito 3

Pancreas divisum, multiple gastrointestinal tumors and the co-occurrence of two germline pathogenic variants: unusual presentation in a neurofibromatosis type 1 patient” 127

CAPÍTULO VII: DISCUSSÃO 145

CAPÍTULO VIII: CONCLUSÕES 152

CAPÍTULO IX: PERSPECTIVAS 155

CAPÍTULO X: REFERÊNCIAS 157

CAPÍTULO XI: ANEXOS 172

ABREVIATURAS

ADP: Adenocarcinoma Ductal Pancreático Pâncreas

AD: Adenocarcinoma Duodenal

CAV: Carcinoma de Ampola De Vater

CCd: Colangiocarcinoma Distal

CP: Carcinoma Periapular

DNMT: *DNA methyltransferase*

FT: Fator de Transcrição

GIST: *Gastrointestinal Tumors*

HDACs: *Histone deacetylases*

HATs: *Histone acetyltransferases*

IMC: Índice de Massa Corporal

LINEs: *Long interspersed nuclear elements*

NIPan: Neoplasia Intraepitelial Pancreática

NIPM: Neoplasia Mucinosas Papilares Intraductais

NCM: Neoplasia Císticas Mucinosas

OMS: Organização Mundial da Saúde

PanN: Tecido Pancreático Normal Adjacentes ao Tumor

SINEs: *Short Interspersed Nuclear Elements*

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas de sobrevivência de acordo com o estágio clínico do câncer de pâncreas, comparando tumores do pâncreas exócrino com tumores do pâncreas endócrino. ...	24
Tabela 2. Características dos pacientes submetidos à cirurgia de ressecção dos carcinomas periampulares (n= 9877).	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mecanismo de doença, função, genes e Síndromes hereditárias associadas ao câncer de pâncreas.	22
Quadro 2. Expressão e consequência biológica das HDACs no ADP.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de progressão do câncer pancreático	29
Figura 2. Localização anatômica da região ampular e carcinomas periampulares	31
Figura 3. Classificação do colangiocarcinoma baseado na localização da árvore biliar.	36
Figura 4. Metilação do DNA e diagrama esquemático da distribuição genômica da metilação do DNA.	38
Figura 5. Estrutura do nucleossoma.....	42
Figura 6. Transição entre eucromatina e heterocromatina mediada pelas acetilases de histonas (HATs) e desacetilases de histonas (HDACs).....	44
Figura 7. Classes de desacetilases de histonas	45
Figura 8. Consequências biológicas da desacetilação de proteínas.	46

RESUMO

A ampola de Vater é uma área de convergência do ducto biliar comum, do ducto pancreático e do duodeno. A região periampular dista em torno de 2cm da ampola de Vater e neoplasias que se originam nesta região são denominadas carcinomas periampulares (CPs). Os CPs incluem quatro grupos tumorais originados da cabeça do pâncreas, da ampola de Vater, ducto biliar distal ou do duodeno e correspondem a 0,5% de todas as neoplasias digestivas. Tumores originados no pâncreas são mais frequentes entre os CPs e estes têm as maiores taxas de mortalidade sendo representados majoritariamente pelo adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), subtipo histológico mais frequente e agressivo. Tumores mais raros como os outros CPs também apresentam altas taxas de mortalidade, mas são menos estudados quanto às suas alterações genéticas e epigenéticas, biologia tumoral e influência de fatores genéticos no prognóstico. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização molecular do adenocarcinoma ductal pancreático e de tumores periampulares com o objetivo de contribuir para melhor compreensão do processo de carcinogênese e identificar marcadores prognósticos relacionados a esses tumores.

Inicialmente, avaliamos o perfil de metilação do DNA no ADP em busca de potenciais alvos terapêuticos nas vias moleculares associadas à carcinogênese. Verificamos que o ADP apresenta genes diferencialmente metilados em relação ao tecido normal adjacente e identificamos diversos genes da via de sinalização do cálcio diferencialmente metilados, e muitos destes são compartilhados com outras vias-chave da carcinogênese pancreática, como as vias Ras e Hippo. Os genes *ADCY8*, *CACNA1A*, *CACNA1B*, *CACNA1H*, e *RYR3*, que controlam o influxo de Ca^{+2} da membrana plasmática no retículo endoplasmático rugoso, estavam mais frequentemente hipermetilados e, mediante análise *in silico* de dados do TCGA, observamos que a redução da expressão desses genes se mostrou associada à redução da sobrevida global nos pacientes. Este achado é relevante, pois pode indicar potenciais marcadores prognósticos e alvos terapêuticos para casos selecionados de ADP. Adicionalmente, os resultados obtidos nesta tese indicam que a via de sinalização

do cálcio parece ter um papel importante desde as etapas muito iniciais da carcinogênese pancreática.

Quanto aos outros CPs, pouco se sabe a respeito da modulação epigenética regulada pelas desacetilases de histonas (HDACs). Assim, caracterizamos o perfil de expressão das HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC7 nestas neoplasias, bem como investigamos o possível papel das mesmas no desenvolvimento dos carcinomas de ampola de Vater (CAVs). Utilizamos bancos de dados de expressão para avaliar o perfil das HDACs e segundo nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a avaliar a sua expressão no adenocarcinoma duodenal. Os CAVs e os adenocarcinomas duodenais apresentaram um perfil de expressão semelhante para *HDAC1* e *HDAC2*. Esse trabalho ainda avaliou, pela primeira vez, a expressão proteica das HDACs em amostras de adenocarcinoma de ampola de Vater (o subtipo histológico mais frequente) e tecidos normais adjacentes (pancreático, ampular e duodenal). Encontramos um perfil de expressão semelhante entre todos os tecidos, sugerindo que estas HDACs não estão diretamente envolvidas na carcinogênese do CAVs, embora possam ter um papel auxiliando o fenótipo tumoral, modulando genes envolvidos proliferação celular, regulação do ciclo celular e apoptose.

Por fim, descrevemos um caso clínico atípico e mais grave de Neurofibromatose 1 com múltiplos tumores periampulares onde a presença de duas variantes germinativas patogênicas em genes distintos (*NF1* e *CFTR*) relacionados a doenças pancreáticas podem ter agido sinergicamente. Em especial, a variante germinativa patogênica do gene *CFTR* associada ao pâncreas *divisum* pode ter contribuído para a ocorrência de múltiplos tumores na paciente portadora de Neurofibromatose tipo 1. Este relato de caso reforça a importância de uma análise molecular mais abrangente, incluindo avaliação de múltiplos genes relacionados ao fenótipo em casos atípicos ou com fenótipo mais grave que o habitual. A informação obtida no estudo de caso será também muito relevante para os familiares do caso índice.

Os resultados desta tese contribuem para o melhor entendimento do perfil genético e epigenético dos adenocarcinomas ductais pancreáticos e de carcinomas

periampulares. Os resultados também indicam importantes linhas de investigação para explorar novas vias de sinalização que possam trazer informações relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

ABSTRACT

Ampulla of Vater is a convergence area of the common bile duct, pancreatic duct, and duodenum. The periampullary region is located within about 2 cm from the ampulla of Vater and neoplasms originated in this region are called periampullary carcinomas (PCs). PCs include four tumoral groups that arise from the pancreatic head, Ampulla of Vater, distal biliary duct or duodenum and correspond to 0.5% of all digestive neoplasms. Tumors originated in the pancreas are the most frequent among PCs and they have the highest mortality rates, being represented mainly by the pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most frequent and aggressive histological subtype. Other PCs are rarer and also have high mortality rates, however, their genetic and epigenetic alterations, tumor biology, and genetic influence in prognostic factors are less studied. In this context, the objective of this study was to perform a molecular characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma and periampullary tumors in order to contribute to a better understanding of the carcinogenesis process and to identify prognostic markers related to these tumors.

First, we evaluated the DNA methylation profile in PDAC samples, searching for potential therapeutic targets in the molecular pathways associated with PDAC carcinogenesis. PDAC showed differentially methylated genes compared to adjacent normal tissue and we identified several differentially methylated genes in the Calcium Signaling Pathway. Many of these are shared with other key pancreatic carcinogenesis pathways, such as the Ras and Hippo pathways. The *ADCY8*, *CACNA1A*, *CACNA1B*, *CACNA1H*, and *RYR3* genes, which control Ca^{2+} influx into the rough plasma membrane or endoplasmic reticulum, were most often hypermethylated. Using *in silico* analysis of TCGA data, we observed that reduced expression of these genes was associated with reduced overall survival in PDAC patients. This finding is relevant as may indicate potential prognostic markers and therapeutic targets for selected PDAC cases. Additionally, the results obtained in this thesis indicate that the calcium signaling pathway seems to play an important role since the very early stages of pancreatic carcinogenesis.

In relation to other PCs, there is little knowledge about epigenetic modulation regulated by histone deacetylases (HDACs). Thus, we characterized the expression profile of HDAC1, HDAC2, HDAC3 and HDAC7 in these neoplasms, as well as investigated their possible role in the development of ampulla of Vater carcinomas (AVCs). We used expression databases to evaluate the profile of HDACs, and to our knowledge, this was the first study to evaluate their expression in duodenal adenocarcinoma. AVCs and duodenal adenocarcinomas showed a similar expression profile for *HDAC1* and *HDAC2*. This work also evaluated, for the first time, the protein expression of HDACs in AVCs samples (the most common histological subtype) and adjacent normal tissues (pancreatic, ampullary and duodenal). We found a similar expression profile among all tissues, suggesting that these HDACs are not directly involved in the AVCs carcinogenesis. Nonetheless, they may play a role supporting the tumor phenotype by modulating genes involved in cell proliferation, cell cycle regulation and apoptosis.

Finally, we described an atypical and more severe case of Neurofibromatosis 1 with multiple periampullary tumors, where the presence of two pathogenic germline variants in different genes (*NF1* and *CFTR*) related to pancreatic diseases may have acted synergistically. In particular, the *CFTR* pathogenic germline variant associated with pancreas *divisum* may have contributed to the occurrence of multiple tumors in the Neurofibromatosis type 1 patient. This case report reinforces the importance of a broader molecular analysis, including evaluation of multiple genes related to phenotype, in atypical cases or with more severe phenotype than usual. The information obtained from the case report will also be very relevant to the case index relatives.

The thesis results contribute to a better understanding of the genetic and epigenetic profile of pancreatic ductal adenocarcinomas and periampullary carcinomas. The results also indicate important research topics to be explored, including new signaling pathways that may provide relevant information for the development of new therapeutic strategies.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1. Câncer e epidemiologia do câncer de pâncreas

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes no ano de 2018 (Iarc, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se 14 milhões de óbitos relacionados a esta doença devam ocorrer no mundo em 2035 (Rahib *et al.*, 2014), reforçando o impacto do câncer como um problema de saúde pública. A crescente incidência e mortalidade vinculada ao câncer podem ter múltiplas explicações, contudo o reflexo do envelhecimento populacional combinado a maior exposição a fatores de risco são aspectos frequentemente reportados (Bray *et al.*, 2018).

Embora o conhecimento científico tenha melhorado a sobrevivência de muitos pacientes oncológicos, os dados relacionados às neoplasias de pâncreas permanecem alarmantes. O câncer de pâncreas é uma das neoplasias mais agressivas, cuja incidência é quase igual à mortalidade, ocupando o 14º lugar no mundo em frequência, mas a sétima posição entre as causas de morte relacionadas ao câncer. A sobrevida global em 5 anos é inferior a 8% e o tempo médio de sobrevida é de 13 a 20 meses após a cirurgia de ressecção do tumor (Neuzillet *et al.*, 2011; Collisson and Maitra, 2017). No Brasil, 10.754 mortes foram relacionadas ao câncer de pâncreas em 2017, correspondendo a 4% do total de óbitos relacionados ao câncer. Nos Estados Unidos, estima-se que o câncer de pâncreas se torne a segunda causa de morte por câncer em 2030 (Inca, 2014; Rahib *et al.*, 2014; Inca, 2018).

1.1. Fatores de risco para câncer de pâncreas

Alguns fatores de risco para ocorrência de tumores pancreáticos estão claramente estabelecidos e incluem idade avançada, sexo masculino, etnia afro-americana, diabetes, obesidade, história pessoal de pancreatite crônica, história familiar de câncer de pâncreas, tabagismo e alcoolismo (Neuzillet *et al.*, 2011; Mcguigan *et al.*, 2018; Tsai and Chang, 2019). Mais recentemente, a pancreatite aguda (Kirkegård *et al.*, 2018) e o tipo de microbiota intestinal (Tsai and Chang, 2019; Wang *et al.*, 2019) foram propostas como fatores de risco importantes para a doença.

Neoplasias pancreáticas são comumente associadas a idade mais avançada, sendo que cerca de 90% dos casos são diagnosticados em pacientes com idade superior a 55 anos (Midha *et al.*, 2016) e a doença atinge seu ápice entre os 60 e os 80 anos de idade (Rawla *et al.*, 2019). Neoplasias pancreáticas são mais incidentes em homens (5,5 por 100.000 para homens, em comparação a 4,0 para 100.000 mulheres) (Bray *et al.*, 2018) possivelmente devido a exposição a fatores ambientais, bem como estilo de vida (maior uso de tabaco e álcool por homens) (Mcguigan *et al.*, 2018).

A associação positiva entre diabetes tipo I e II e o risco de câncer de pâncreas tem sido relatada ao longo dos anos (Mcauliffe and Christein, 2013; Pezzilli and Pagano, 2013; Batabyal *et al.*, 2014; Maisonneuve and Lowenfels, 2015) . Um estudo epidemiológico da população italiana revelou que cerca de 9,7% dos tumores pancreáticos são devidos à diabetes (Rosato *et al.*, 2015). Alguns estudos mostram que ter diabetes pode aumentar o risco de desenvolver câncer de pâncreas em 1,8 vezes, particularmente em homens asiáticos e hispânicos, em comparação com brancos e negros (Li *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2012).

A pancreatite é uma inflamação do pâncreas que induz dano pancreático pela ativação precoce de enzimas digestivas, ainda no parênquima pancreático onde são produzidas e antes de sua liberação no intestino delgado (Rawla *et al.*, 2019). Alguns estudos indicam que a pancreatite crônica pode elevar o risco relativo de desenvolver câncer de pâncreas em 5-16 vezes (Raimondi *et al.*, 2010; Kirkegard *et al.*, 2017). A principal causa de pancreatite crônica é o consumo de álcool (70-80%), mas outros fatores de risco foram identificados como tabagismo, doenças auto-imunes, distúrbios metabólicos, obstrução ductal, anomalias anatômicas como o pâncreas *divisum* e fatores hereditários (Elsherif *et al.*, 2019). Variantes patogênicas germinativas nos genes *PRSS1*, *SPINK1* ou *CFTR* associadas ao pâncreas *divisum* conferem maior predisposição à pancreatite e em muitos indivíduos os episódios de pancreatite são precoces e recorrentes, conseqüentemente aumentando o risco de câncer de pâncreas (Zhan *et al.*, 2018; Lee and Papachristou, 2019) . O papel da pancreatite aguda como fator predisponente ao câncer de pâncreas foi muito discutido e permaneceu

controverso por anos, mas estudos recentes sugerem que a doença pode conferir maior risco para o desenvolvimento de neoplasias pancreáticas (Chung *et al.*, 2012; Munigala *et al.*, 2014; Kirkegård *et al.*, 2018) . O que deve ser ressaltado é que o risco parece estar limitado a pacientes com pancreatite aguda que evoluem para pancreatite crônica (Rijkers *et al.*, 2017; Lee and Papachristou, 2019).

Obesidade é outro fator de risco potencial que vem chamando atenção de muitos pesquisadores. Li *et al.*, associou o índice de massa corporal (IMC) relacionado ao sobrepeso e obesidade ($25,0 - 29,9 \text{ kg / m}^2$ e $\geq 30 \text{ kg / m}^2$) com um maior risco de desenvolver câncer de pâncreas, durante o início da idade adulta. Além disso, a obesidade em uma idade mais avançada (30 - 79 anos) foi associada a menor sobrevivência global (Li *et al.*, 2009). Um estudo que avaliou 14 coortes com mais de 2.000 casos de câncer de pâncreas constatou que os obesos apresentavam risco 54% maior de desenvolver câncer de pâncreas (Genkinger *et al.*, 2011).

Em relação aos fatores ambientais, o tabagismo é o fator de risco mais importante e consistente. Aproximadamente 20 a 25% dos tumores pancreáticos podem ser atribuídos ao tabagismo (Raimondi *et al.*, 2009) e o risco é quase duas vezes maior em fumantes do que em não fumantes e aumenta com a duração e o número de cigarros consumidos diariamente (Kuzmickiene *et al.*, 2013; Mizuno *et al.*, 2014). O risco pode persistir por 10-15 anos após a cessação do tabagismo (Iodice *et al.*, 2008; Lynch *et al.*, 2009). Outro fator que tem sido associado ao câncer de pâncreas, porém de forma menos consistente, é o alcoolismo. Os estudos são controversos a respeito do seu impacto no desenvolvimento desta neoplasia, contudo um risco aumentado de 15% foi relacionado ao alto consumo de álcool, não havendo associação de consumo baixo ou moderado com a doença (Wang *et al.*, 2016). Por fim, um grande estudo caso-controle em 2010 não encontrou associação geral significativa entre a ingestão total de álcool e o risco de câncer de pâncreas, embora para consumo $\geq 45\text{g}$ de álcool por dia, o risco tende a aumentar em homens (Pelucchi *et al.*; Michaud *et al.*, 2010) . Ainda que a relação causal entre álcool e câncer de pâncreas seja controversa, sabe-se que o

consumo excessivo de álcool também é a principal causa de pancreatite crônica, que é um fator de risco estabelecido para câncer de pâncreas (Samokhvalov *et al.*, 2015).

Estima-se que cerca de 5 a 10% dos pacientes com câncer de pâncreas tenham história familiar da doença (Greer *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2009). O câncer de pâncreas familiar é definido pela presença de dois ou mais familiares de primeiro ou segundo grau acometidos por esse tumor. Familiares de primeiro grau de pacientes com câncer pancreático têm um risco nove vezes maior de desenvolver esse diagnóstico quando comparados à população em geral (Klein *et al.*, 2004), e quando há dois familiares de primeiro grau diagnosticados este risco duplica, podendo chegar a um 32 vezes maior para pessoas com mais de três familiares de primeiro grau afetados (Greer *et al.*, 2007; Vincent, Herman, *et al.*, 2011). Estes dados epidemiológicos atestam a importância de fatores hereditários/genéticos na etiologia da doença. Ademais, o câncer de pâncreas é parte do espectro tumoral de algumas síndromes de predisposição hereditária ao câncer incluindo a Síndrome de Peutz-Jeghers, Síndrome do Melanoma Familiar, Síndrome de câncer de mama e ovário hereditários, câncer colorretal hereditário não-polipomatoso, polipose adenomatosa familiar e Síndrome de Li-Fraumeni, entre outras (Zhan *et al.*, 2018). Especificamente para neoplasias neuroendócrinas, a Neoplasia endócrina múltipla tipo 1, Síndrome de von Hippel-Lindau, Neurofibromatose tipo 1, Esclerose tuberosa são síndromes bem estabelecidas e associadas a esses tumores. Em geral, tumores neuroendócrinos associados às síndromes hereditárias possuem uma apresentação multifocal multifocal (Guilmette and Nosé, 2019) (Tabela1).

Quadro 1. Mecanismo de doença, função, genes e Síndromes hereditárias associadas ao câncer de pâncreas (adaptado de Zhan et al., 2018; Guilmette and Nosé, 2019).

Mecanismos de doença	Função	Genes	Síndrome associada
Dano celular (suscetibilidade à pancreatite)	Protease, a ativação prematura induz a pancreatite.	<i>PRSS1</i>	Pancreatite hereditária
	Inibidor de tripsina.	<i>SPINK1</i>	Pancreatite hereditária
	Metabolismo da glutathione, defesa antioxidante.	<i>GGT1</i>	Risco para câncer de pâncreas
	Degradação prematura da tripsina ativada.	<i>CTRC</i>	Pancreatite hereditária
	Canal iônico necessário para secreção / absorção de células epiteliais.	<i>CFTR</i>	Fibrose cística, pancreatite hereditária
	Regulação e parada do ciclo celular após dano ao DNA, apoptose.	<i>TP53</i>	Síndrome de Li-Fraumeni
	Supressor de tumor, inibição de crescimento.	<i>SMAD4</i>	Telangiectasia hemorrágica hereditária, síndrome da polipose juvenil, síndrome de Myhre
Crescimento celular / controle do ciclo	Resposta a danos no DNA a quebras de fita dupla.	<i>ATM</i>	Ataxia Telangiectasia
	Regulador do ponto de verificação do ciclo celular e resposta a danos no DNA a quebras de fita dupla.	<i>CHEK2</i>	Síndrome de Li-Fraumeni
	Parada celular nos postos de controle G1 e G2, apoptose.	<i>CDKN2A</i>	Síndrome do Melanoma Múltiplo Familiar Atípico
	Regula o crescimento celular, proliferação e resposta a danos no DNA.	<i>STK11</i>	Síndrome de Peutz-Jeghers
	Regula o ciclo celular, a sobrevivência e o metabolismo.	<i>PTEN</i>	Síndrome do tumor PTEN-hamartom

Quadro 1. Continuação.

Mecanismos de doença	Função	Genes	Síndrome associada
Reparo do DNA	Reparo de quebra dupla no DNA.	<i>BRCA1,</i> <i>BRCA2</i> <i>BARD1</i>	Síndrome hereditária do câncer de mama e ovário
	Reparo de quebra dupla no DNA.	<i>PALB2,</i> <i>FANCA,</i> <i>FANCC,</i> <i>FANCG</i> <i>FANCM</i>	Anemia de Fanconi
	Reparo de bases mal pareadas.	<i>MLH1, MSH2,</i> <i>MSH6, PMS2</i> <i>e EPCAM *</i>	Síndrome de Lynch
	Reparo de danos ao DNA.	<i>NBN</i>	Síndrome de quebras de Nijmegen
Adesão celular	Regula a migração e adesão celular, antagonista da via Wnt.	<i>APC</i>	Polipose adenomatosa familiar
Apoptose	Regulador transcricional, sendo componente essencial do complexo MLL/SET1 .	<i>MEN1</i>	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1
	Regulada ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal de proteínas.	<i>VHL</i>	Síndrome de von Hippel-Lindau
	Regula atividade GTPase da oncoproteína Ras.	<i>NF1</i>	Neurofibromatose tipo 1
	Reguladores da via mTOR.	<i>TSC1 TSC2</i>	Esclerose tuberosa

*Deleções nos últimos éxons do *EPCAM* inativam *MSH2* e podem causar indiretamente defeitos no reparo de bases mal pareadas.

1.2. Classificação histopatológica dos tumores do pâncreas

As neoplasias do pâncreas compreendem um amplo conjunto de tumores e são geralmente classificadas de acordo com sua diferenciação histológica e comportamento biológico. As neoplasias do pâncreas endócrino são representadas pelos tumores originários e não-originários das ilhotas pancreáticas e embora sejam relativamente raras (incidência de 0,43 por 100.000 pessoas ao ano nos Estados Unidos) estão associadas a melhor prognóstico em relação aos tumores exócrinos do pâncreas (Fernández Pérez *et al.*, 2018) (Tabela 2). Os tumores do pâncreas exócrino, que constituem 90% dos tumores de pâncreas, são na grande maioria adenocarcinomas ductais pancreáticos (ADP) ou variantes destes (Neuzillet *et al.*, 2011).

Tabela 1. Taxas de sobrevida de acordo com o estágio clínico do câncer de pâncreas, comparando tumores do pâncreas exócrino com tumores do pâncreas endócrino (adaptado de Rawla *et al.*, 2019).

Estágio clínico	Sobrevida em cinco anos (%)	
	Câncer de pâncreas exócrino	Câncer de pâncreas endócrino (PanNET) tratado com cirurgia
I A	14	61
IB	12	61
II	7	52
III	3	41
IV	1	16

1.2.1. Adenocarcinoma ductal pancreático

O ADP é uma neoplasia sólida de caráter infiltrante e intensa reação não-neoplásica no tecido adjacente, composta por fibroblastos, linfócitos e matriz extracelular (reação desmoplásica). Microscopicamente, observam-se glândulas malignas atípicas, irregulares, pequenas e geralmente revestidas por células epiteliais cubóides a colunares anaplásicas e formação de estruturas tubulares ou agregados celulares (Haeberle and Esposito, 2019). (Maitra and Hruban, 2008) As lesões precursoras do ADP podem ser divididas em precursores microscópicos e macroscópicos. Os precursores microscópicos incluem a neoplasia intra-intrapitelial pancreática (NIPan), que são mais frequentes e melhor caracterizadas; e as lesões

planas atípicas. NIPans 1A, 1B e 2 são classificadas como lesões de baixo grau de malignidade, enquanto NIPan 3 é classificada como lesão de alto grau. As lesões precursoras macroscópicas são caracterizadas pela visibilidade em exames de imagem, sendo representadas pelas neoplasias mucinosas papilares intraductais (NMPI), neoplasias císticas mucinosas (NCM) e neoplasias tubulopapilares intraductais. As duas primeiras são caracterizadas pela produção de mucina (Maitra and Hruban, 2008; Bosman *et al.*, 2010), ao contrário das neoplasias tubulopapilares intraductais que raramente produzem essas glicoproteínas, portanto, geralmente não se apresentam como lesões císticas (Yamaguchi *et al.*, 2013).

1.2.1.1. Diagnóstico, agressividade e tratamento do adenocarcinoma ductal pancreático

O ADP em estágios iniciais é geralmente clinicamente silencioso, e a maioria dos pacientes que apresentam sintomas atribuíveis a neoplasia possuem tumores localmente avançados e/ou metástases (80-90% dos casos), que contraídicam ou dificultam a ressecção cirúrgica (Neuzillet *et al.*, 2011; Vincent, Herman, *et al.*, 2011; Rawla *et al.*, 2019). Diversos fatores contribuem para esse panorama, como sinais e sintomas inespecíficos da doença, limitações metodológicas relacionadas aos exames de diagnóstico, e biologia tumoral agressiva.

A sintomatologia do ADP geralmente é inespecífica e depende em grande parte da localização do tumor e estágio da doença: em cerca de 65% dos casos o tumor está localizado na cabeça do pâncreas, em 15% no corpo/cauda e em 20% dos casos o tumor envolve o órgão de uma forma difusa. A obstrução da via biliar frequentemente é relacionada a tumores localizados na cabeça do pâncreas, causando colestase, que se expressa por icterícia, colúria e acolia. Além disso, dor abdominal, glicemia alterada, astenia, anorexia e perda de peso são manifestações recorrentes que podem ser relacionadas a um grande número de doenças como colangite, colecistite, colelitíase, coledocolitíase, cistos de colédoco, pancreatite, entre outras (Hidalgo, 2010; Simianu *et al.*, 2010; Rawla *et al.*, 2019).

Atualmente, as ferramentas de diagnóstico / estadiamento pré-operatórias são a ultrassonografia abdominal, tomografia computadorizada com protocolo pancreático trifásico (padrão ouro para o diagnóstico e estadiamento) (Wong and Lu, 2008; Klauss *et al.*, 2009), ressonância magnética e aspiração por agulha fina guiada por ultrassonografia endoscópica. Embora os três primeiros exames sejam fundamentais para a conduta terapêutica e determinação do estadiamento, a detecção de lesões pequenas (<2 cm), com ausência de dilatação biliar, e envolvimento vascular são difíceis de serem visualizadas. Nessas situações, a aspiração por agulha fina guiada por ultrassonografia endoscópica tem sensibilidade relatada em cerca de 80% dos casos (Harewood and Wiersema, 2002; Guarneri *et al.*, 2019), contudo é um exame de alto custo e não disponível em todos os serviços de saúde, mesmo para indivíduos de alto risco. Além disso, em pacientes sintomáticos, a avaliação do antígeno de superfície CA19-9 pode ajudar a confirmar o diagnóstico e prever prognóstico e recorrência após a ressecção (Tempero *et al.*, 2017). No entanto, o CA19-9 possui limitações importantes, como a não-especificidade para câncer de pâncreas ou sua ausência em pacientes que são negativos para o antígeno de Lewis a ou b (5 a 10% da população caucasiana). Pacientes com o antígeno de Lewis a ou b podem possuir resultados falsos negativos para os níveis séricos de CA 19-9 mesmo na presença de câncer pancreático avançado (Scarà *et al.*, 2015).

Uma característica peculiar do ADP é a existência de um extenso estroma desmoplásico associado a células mielóides infiltrantes (Dougan, 2017). A hipóxia é outra característica importante do microambiente tumoral que, ligada à desmoplasia, atua como barreira à infiltração de células T (Ene-Obong *et al.*, 2013; Özdemir *et al.*, 2014; Daniel *et al.*, 2019). Além disso, dentre as células mielóides, os macrófagos associados ao tumor são uma das células mais abundantes e promovem, no tumor, eventos mitóticos e angiogênicos, e inibição da apoptose (Zhu *et al.*, 2017). Outra particularidade do ADP é sua progressão precoce para doença metastática (Kleeff *et al.*, 2016). Os pacientes comumente apresentam metástases hepáticas, na cavidade peritoneal, pulmões e outros órgãos gastrointestinais (Poruk *et al.*, 2013) em estágios

avançados, mas estas já podem aparecer em estágios iniciais. De fato, foi observado por Rhim e colaboradores que o desenvolvimento de metástases pode acontecer concomitantemente ao aparecimento da lesão intraepitelial pancreática em um modelo animal. Tais dados podem explicar por que pacientes que realizam cirurgia de ressecção total do tumor com boas margens e sem nenhum sinal de metástase no momento da cirurgia apresentam recidivas relacionadas ao sítio primário poucos meses após o procedimento (Rhim *et al.*, 2012).

O único tratamento do ADP com potencial curativo é a ressecção cirúrgica, contudo, devido às características mencionadas acima, apenas 20% dos pacientes diagnosticados são elegíveis a cirurgia. Em relação ao tratamento não-cirúrgico, uma característica marcante do ADP é o seu alto grau de resistência a praticamente qualquer tipo de terapias disponíveis (Amrutkar and Gladhaug, 2017; Grasso *et al.*, 2017; Morrison *et al.*, 2018). Os agentes quimioterápicos usados atualmente são os do esquema FOLFIRINOX (5-fluoracil, oxaliplatina e irinotecano) ou gemcitabina combinada com nab-paclitaxel (Orth *et al.*, 2019).

1.2.1.2. *Biologia molecular do adenocarcinoma ductal pancreático*

Entre os grandes desafios das pesquisas em câncer está a elucidação das alterações genéticas responsáveis pela iniciação e progressão tumoral de cada tipo de câncer e o desenvolvimento de terapias específicas para cada uma dessas etapas. Nesse contexto, a genômica tem contribuído para a identificação de biomarcadores que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese e de alvos moleculares potenciais.

Hruban e colaboradores definiram um modelo de progressão genética para o desenvolvimento do ADP, no qual são descritas alterações genéticas e epigenéticas nas lesões pré-malignas do ADP (Hruban *et al.*, 2000; Omura and Goggins, 2009) (Figura 1). Nas fases iniciais da lesão, observamos a ativação de genes, em especial do gene *KRAS*, com mutações presentes em cerca de 30% das lesões iniciais e em 95% das lesões avançadas de ADP. Alterações na família RAS de oncogenes induzem

a proliferação, sobrevivência e invasão celular. A superexpressão do gene *ERBB2* também está presente nas NIPans 1A-1B. A telomerase é ativada no final da progressão do ADP, sendo um ponto fundamental para o processo de imortalização das células tumorais (Bardeesy and Depinho, 2002).

O desenvolvimento do processo neoplásico se consolida com a ocorrência de mutações de perda de função em genes supressores de tumor. A perda de função do gene *CDKN2A* é encontrada em 80-95% das NIPans 2-3 e ADPs em estágios avançados. O gene *CDKN2A* está estritamente relacionado à transcrição dos genes supressores de tumor *INK4* e *ARF* e, desta forma, quando há alteração em sua função ocorre um distúrbio nas vias de sinalização do retinoblastoma (Rb) e de p53 (Liggett and Sidransky, 1998; Bardeesy and Depinho, 2002). Mutações no gene *TP53* são encontradas em 50-75% dos casos de ADP (Redston *et al.*, 1994), sendo mais pronunciadas nas NIPans 2-3. Como consequência da perda de função da proteína p53, se observa instabilidade genômica. Mutações no gene *BRCA2* são eventos mais tardios da progressão do ADP e indivíduos portadores de mutações herdadas nesse gene apresentam um risco significativo de desenvolvimento de câncer de mama, ovário e, menos frequentemente, pâncreas (Bardeesy and Depinho, 2002). Deleções ou mutações no gene *SMAD4/DPC4* podem estar presentes em até 55% dos ADPs (Liu, 2001) e sua função está intimamente ligada à via de sinalização TGF- β , que tem um papel fundamental no bloqueio do crescimento das células epiteliais normais. Desta forma, alterações na expressão desse gene impedem o bloqueio do ciclo celular ou apoptose (Bardeesy and Depinho, 2002).

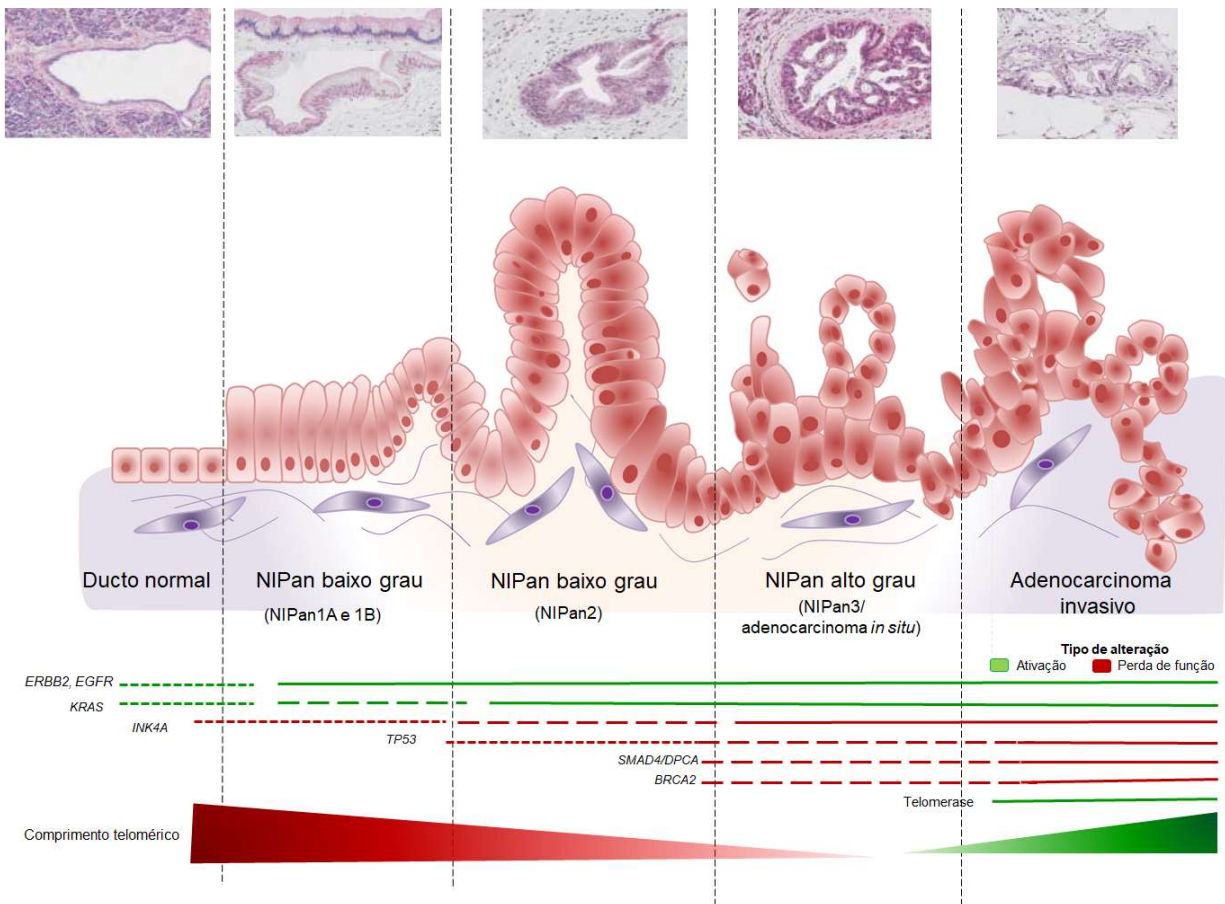


Figura 1. Modelo de progressão do câncer pancreático (adaptado de Hruban et al., 2000; Bardeesy and Depinho, 2002; Alemar et al., 2015). NIPan= neoplasia intra-intrapitelial pancreática.

Outra alteração genética importante na carcinogênese do ADP é a ocorrência de variações no número de cópias (do inglês, *copy number variation*, CNV) definidas por variações estruturais de segmentos iguais ou maiores que 1 kilobase (deleções ou duplicações). As CNVs podem representar uma importante fonte de variabilidade genética e fenotípica, mas também são responsáveis por muitas doenças complexas como o câncer (Fanciulli *et al.*, 2010). CNVs correspondem a uma fração importante da variabilidade genética importante, e podem modular a expressão gênica (Iafrate *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2007). Nas lesões precursoras do ADP em pacientes com história familiar, CNVs ocorrem com relativa frequência, sendo que em

um estudo, CNVs foram identificadas em 7/37 amostras, inclusive com ocorrência de CNVs em mais de um *locus* em algumas lesões. Nos cromossomos com perfil alterado, contudo, não foi identificada nenhuma deleção em genes supressores de tumor ou amplificação de oncogenes (Hong *et al.*, 2012). Em uma tentativa recente de correlacionar CNVs a predisposição genética ao desenvolvimento do ADP, Willis *et al.*, utilizaram amostras de DNA genômico (sangue ou saliva) de 263 pacientes, mas não observaram uma contribuição substancial destas alterações para a etiologia da doença (Willis *et al.*, 2014).

2. Região periampular e carcinomas periampulares

A ampola de Vater é uma área de convergência do ducto biliar comum, do ducto pancreático e do duodeno (Kunath and Hommerding, 1981; Kim *et al.*, 2002). A estrutura é anatomicamente complexa e heterogênea, sendo formada por fibras musculares e elementos neuronais especiais que regulam, através da papila duodenal (ou esfíncter de Oddi), o fluxo da bile e suco pancreático para o trato digestivo (Kunath and Hommerding, 1981; Ishibashi *et al.*, 2000) (Figura 2). Do ponto de vista histológico, e corroborado por análises morfológicas e imuno-histoquímicas, a Ampola de Vater apresenta dois revestimentos epiteliais distintos, o pancreatobiliar e o intestinal. A região periampular dista em torno de 2cm da ampola de Vater e compreende as seguintes estruturas: pâncreas (ao nível da cabeça do órgão), Ampola de Vater, ducto biliar distal e duodeno (Haddad, 2009; Gaspar *et al.*, 2013; He *et al.*, 2014).

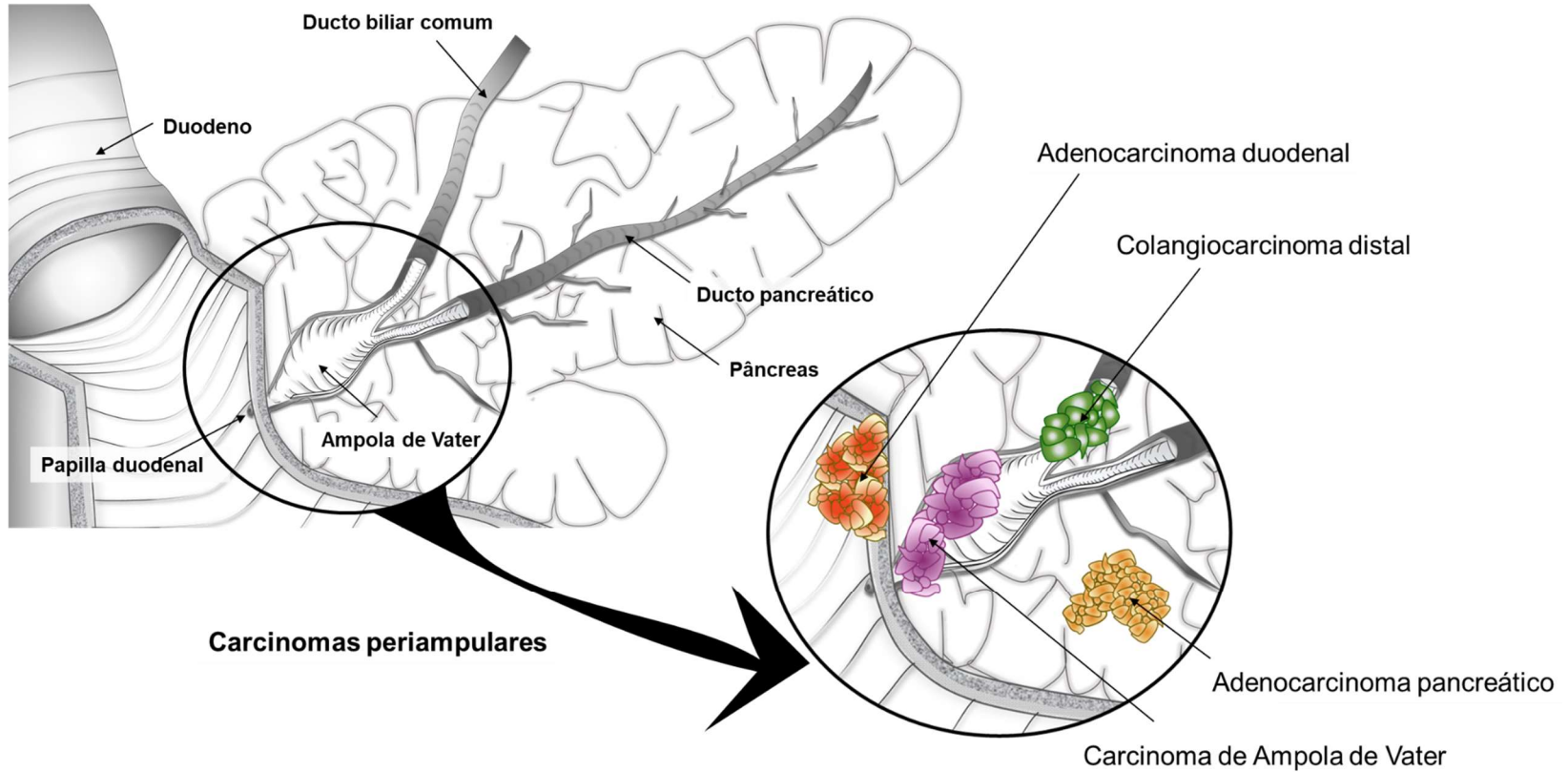


Figura 2. Localização anatômica da região ampular e carcinomas periampulares (figura elaborada pela autora).

Neoplasias que se originam dentro dessa região são denominadas carcinomas periampulares (CP). A precisa classificação diagnóstica do local primário desses tumores é difícil mesmo com a existência de uma avaliação histopatológica padronizada. Em geral, os CPs envolvem mais de um potencial local de origem destroem

a anatomia periampular normal e apresentam displasia epitelial em mais de uma porção da região, dificultando o diagnóstico (Monson *et al.*, 1991; Lüttges *et al.*, 1999; Fisher and Bakey, 2007).

Os CPs compreendem 0,5% de todas as neoplasias digestivas (Albores-Saavedra *et al.*, 2009) e suas taxas de incidência são inferiores a 1/100.000 casos por ano na população mundial. Dados da região sudeste do Brasil indicam uma taxa de 0,7/100.000 casos na população oriunda de São Paulo-Brasil (Randi *et al.*, 2009; Gaspar *et al.*, 2013). Entre todos os CPs, tumores pancreáticos são os mais frequentes, seguidos dos tumores da ampola de Vater, ducto biliar distal e duodeno (Kamarajah, 2018) (Tabela 3).

Tabela 2. Características dos pacientes submetidos à cirurgia de ressecção dos carcinomas periampulares (n= 9877) (adaptado de Kamarajah, 2018).

	Local de origem			
	Pâncreas	Ampola de Vater	Ducto biliar distal	Duodeno
Histologia predominante	Adenocarcinoma pancreático (ADP)	Adenocarcinoma de ampola de Vater (CAV)	Colangiocarcinoma distal (CCd)	Adenocarcinoma Duodenal (AD)
Frequência	79%	11%	6%	4%
Sobrevida em 5 anos	19%	47%	32%	42%

A taxa de sobrevida em 5 anos de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica com CAV, CCd e DA varia de 32 a 47% e são significativamente melhores do que as observadas em pacientes com ADP (Kamarajah, 2018). Esses dados sugerem que as diferenças na biologia do tumor também podem ser uma explicação para a sobrevida relativamente mais favorável dos pacientes com estas doenças.

2.1. Carcinoma periampular originado do pâncreas

Segundo a classificação dos carcinomas periampulares, os tumores pancreáticos podem ser considerados periampulares quando estiverem localizados na cabeça do pâncreas distando de 2cm da ampola de Vater. O ADP, subtipo histológico

mais prevalente das neoplasias pancreáticas, foi extensamente discutido e caracterizado nas sessões anteriores e não será abordado neste tópico.

2.2. Carcinoma periampular originado da ampola de Vater

Em virtude da Ampola de Vater possuir os revestimentos epiteliais pancreatobiliar e intestinal, os tumores originados dessas estruturas apresentam a histologia de adenocarcinoma pancreatobiliar ou intestinal (carcinomas de ampola de Vater, CAV). Em situações nas quais há a coexistência de aspectos de ambos os subtipos, o tumor é denominado adenocarcinoma misto (Kimura *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2013; Yachida *et al.*, 2016; Who *et al.*, 2019). O subtipo misto é o subgrupo predominante de CAVs, representando até 40% dos casos (Gingras *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2017; Mafficini *et al.*, 2018).

O subtipo intestinal é frequentemente associado a um componente não invasivo (adenoma duodenal). A análise histopatológica deste subtipo aponta carcinomas compostos de glândulas tubulares bem formadas, com áreas cribriformes complexas em forma de ninhos sólidos, que são indistinguíveis do adenocarcinoma colorretal. As células tumorais são colunares, altas e pseudoestratificadas, frequentemente contendo mucina, com núcleos ovais ou em forma de “charuto” localizados basalmente (Kimura *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 2004; Kumari *et al.*, 2013). Ainda, o tumor está relacionado com uma melhor sobrevida quando comparado ao subtipo pancreatobiliar (Carter *et al.*, 2008; Westgaard *et al.*, 2008; Kohler *et al.*, 2011), pois os fatores patológicos relacionados à agressividade, como invasão linfovascular e perineural, não são tão frequentes (Howe *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2004; Westgaard *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). O subtipo pancreatobiliar é morfológicamente semelhante ao ADP. Entre suas características morfológicas destacam-se presença de glândulas simples ou ramificadas e pequenos ninhos de células circundados por um denso estroma desmoplásico. As células tumorais são cubóides ou colunares baixas, dispostas em uma única camada, sem pseudoestratificação. Os núcleos são arredondados apresentando marcado pleomorfismo (Kimura *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 2004; Kumari *et al.*, 2013).

2.2.1. Etiologia dos carcinomas de ampola de Vater

A maioria dos CAVs não apresentam etiologia evidente (Ohike *et al.*, 2010; Adsay *et al.*, 2012), embora algumas doenças inflamatórias (Doença de Crohn e Doença celíaca) e procedimentos cirúrgicos prévios tenham sido reportados como causas (WHO, 2019). Condições hereditárias como a Polipose adenomatosa familiar, Síndrome de Lynch e Síndrome de Peutz-Jeghers foram associadas a maior risco de adenocarcinomas na região enquanto a Neurofibromatose tipo 1 está associada a presença de tumores neuroendócrinos da ampola (Relles *et al.*, 2010).

2.2.2. Alterações moleculares dos carcinomas de ampola de Vater

A heterogeneidade morfológica marcante dos CAVs e a falta de confiabilidade prognóstica da classificação histológica (mesmo com o auxílio de painéis imunohistoquímicos) levaram à investigação de alterações moleculares a fim de melhor definir o prognóstico e o tratamento dessas neoplasias.

Atualmente, alguns grupos de pesquisa têm investigado características moleculares em CAV, contudo mais estudos são necessários para o entendimento completo da carcinogênese nesta neoplasia rara. Alterações no gene *KRAS* são mais frequentemente relatadas em pacientes com CAV (Schönleben *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2014; Sandhu *et al.*, 2015; Valsangkar *et al.*, 2015), contudo não foi encontrada prevalência significativa de mutações ativadoras nos oncogenes *BRAF* e *PIK3CA* (Overman *et al.*, 2013). Em um estudo, a expressão proteica de p53, p21 e Bcl2 (proteínas ligadas à supressão tumoral) em 92 casos de CAV foram avaliados, e os achados imunohistoquímicos indicaram superexpressão de p53 e p21 e subexpressão de Bcl2 no tumor em comparação com tecido não tumoral (Guo *et al.*, 2014). Adicionalmente, assinaturas moleculares de mRNA de CAV foram avaliadas em dois estudos. No primeiro Sandhu *et al.*, observaram a superexpressão de *WNT3A*, *TGFB1*, *HDAC*, *BDNF* e *ERBB4* no subtipo pancreatobiliar, enquanto *CDKN2A*, *RB1* e *PPARA* tinham o mesmo perfil de expressão no subtipo intestinal (Sandhu *et al.*, 2015). No segundo estudo, Overman *et al.*, não conseguiram identificar diferenças significativas

entre os dois subtipos histológicos, provavelmente em função do pequeno tamanho amostral (n=14). Entretanto conseguiram identificar claramente que o CAV apresenta um perfil de expressão gênica diferente do perfil de ADP (Overman *et al.*, 2013). Por fim, Gingras *et al.*, realizaram sequenciamento exômico e analisaram a variação do número de cópias em 160 amostras de tumores da região ampular, sendo este o estudo mais robusto de CAV até o presente momento. Como resultado, 98 amostras foram classificadas como CAV e apresentaram alta frequência de mutações de inativação do gene *ELF3*, instabilidade de microssatélite e deleções e ampliações focais comuns; sugerindo que essas alterações são “marcas” frequentes na patogênese molecular destes tumores (Gingras *et al.*, 2016).

2.3. Carcinoma periampular originado do ducto biliar distal

O colangiocarcinoma é uma neoplasia epitelial, que pode se originar em diversos locais dentro da árvore biliar. A classificação dos tumores é baseada na sua localização anatômica e inclui os colangiocarcinomas intra-hepático e extra-hepático (peri-hilar e distal) (Razumilava and Gores, 2014). O colangiocarcinoma distal (CCd) está localizado entre a origem do ducto cístico e a ampola de Vater, e apenas essa classificação é considerada um tipo de carcinoma periampular, correspondendo a cerca de 40% dos colangiocarcinomas (Deoliveira *et al.*, 2007) (Figura 3).

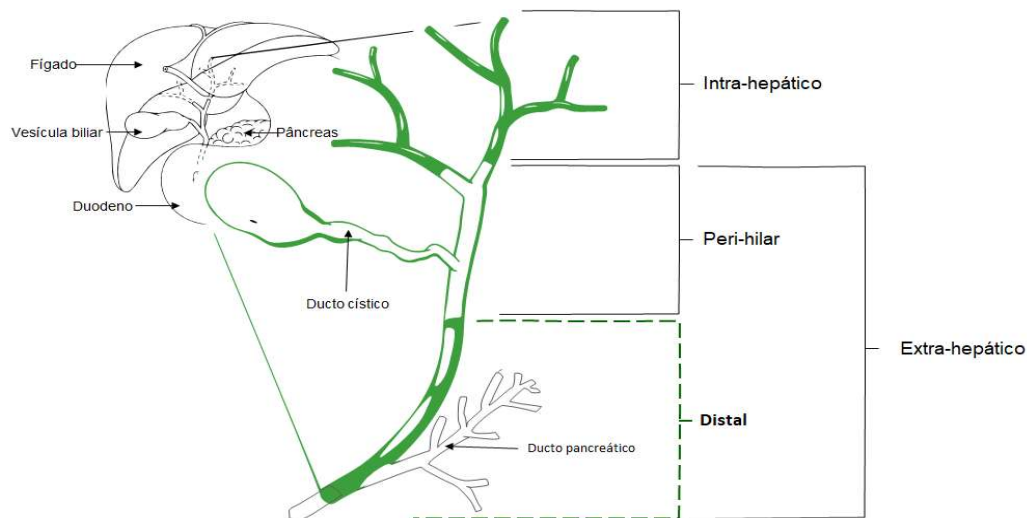


Figura 3. Classificação do colangiocarcinoma baseado na localização da árvore biliar (adaptado de Foundation, 2020).

2.4. Carcinoma periampular originado do duodeno

O adenocarcinoma duodenal representa menos de 1% de todos os tumores gastrointestinais (Overman *et al.*, 2010; Overman *et al.*, 2012) e 4% dos carcinomas periampulares (Kamarajah, 2018). De acordo com estudos epidemiológicos, adenocarcinomas e tumores neuroendócrinos são as neoplasias mais frequentes do duodeno seguidas por tumores estromais gastrointestinais (do inglês *gastrointestinal stromal tumor*, GIST) e maligno (Terada, 2012).

A maior parte dos GISTs é assintomática (Beltran and Cruces, 2007) e geralmente são achados incidentais em tomografias de abdômen, durante endoscopia ou em procedimentos cirúrgicos para outras manifestações abdominais (Parab *et al.*, 2019). Cerca de 75-80% dos GISTs apresentam mutação no gene *KIT* e 10% no gene *PDGFRA*. Embora a maior parte dos tumores seja esporádico, os GISTs foram descritos em algumas síndromes de predisposição hereditária ao câncer destacando-se entre estas a neurofibromatose tipo1 (NF1). Entre os tumores observados em pessoas com NF1, cerca de 34% são GISTs (Gutmann *et al.*, 1997; Relles *et al.*, 2010).

3. Epigenética

Segundo Feinberg, a epigenética é definida como o conjunto de modificações do genoma, transmitidas durante a divisão celular, que não envolvem uma alteração na sequência de DNA (Feinberg, 2001). Alterações epigenéticas podem resultar na ativação ou inibição inapropriada de várias vias de sinalização, levando ao desenvolvimento de diversas doenças, inclusive câncer (Jones and Baylin, 2002; Egger *et al.*, 2004). Uma peculiaridade da regulação epigenética é a característica de ser um processo reversível e que pode agir sobre uma área extensa, incluindo mais do que um único gene (Omura and Goggins, 2009).

Os principais mecanismos de regulação epigenética são as modificações na conformação das histonas, metilação do DNA (Sawan *et al.*, 2008; Lomberk and Urrutia, 2015), que alteram a acessibilidade da cromatina, regulando a transcrição local ou global (Lund and Van Lohuizen, 2004). Além disso, os miRNAs podem atuar como moduladores epigenéticos, controlando os níveis das principais enzimas responsáveis por reações epigenéticas, como as metiltransferases de DNA (do inglês *DNA methyltransferases*, DNMTs), desacetilases de histonas (do inglês *histone deacetylases*, HDACs) entre vários outros reguladores epigenéticos (Yao *et al.*, 2019).

3.1. Metilação do DNA

Entre as modificações epigenéticas, a metilação do DNA tem um papel relevante em diversos processos biológicos, incluindo a embriogênese, envelhecimento e carcinogênese. A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA, na qual um grupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5 de uma citosina, que geralmente precede uma guanina, pela ação das DNA-metiltransferases (do inglês *DNA methyltransferases*, DNMTs)(Figura 4A) (Razin, 1998).

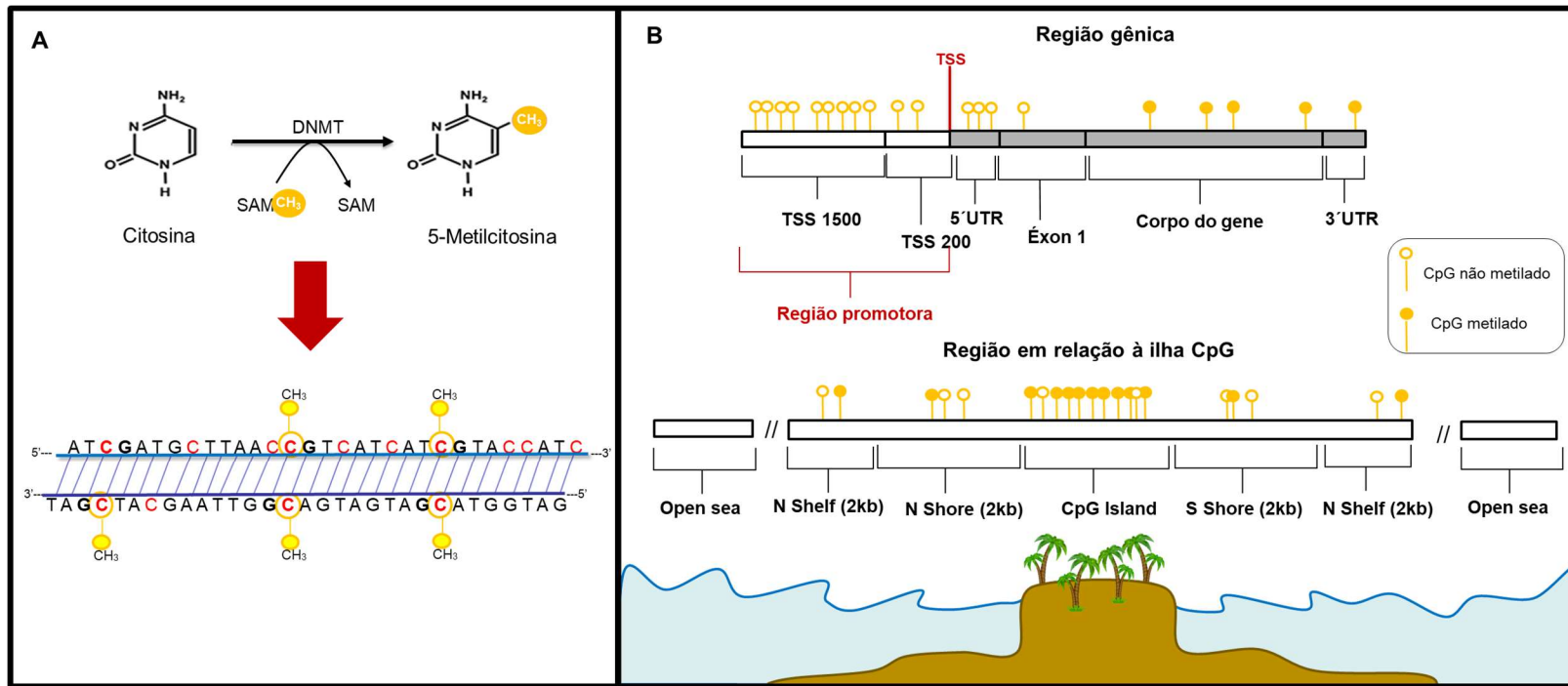


Figura 4. Metilação do DNA e diagrama esquemático da distribuição genômica da metilação do DNA. A, Representação da ligação do grupo CH₃ no carbono 5 da citosina gerando a 5-metilcitosina, o processo mediado pelas enzimas DNA metiltransferases. **B,** Distribuição dos dinucleotídeos CpG em relação ao gene e em relação às ilhas (figura elaborada pela autora).

A metilação do DNA ocorre principalmente em regiões ricas em conteúdo CG, chamadas ilhas CpG, frequentemente encontradas em regiões promotoras ou próximas a estas. As ilhas são definidas como regiões genômicas com mais de 500 pares de bases de comprimento, com um grande número de dinucleotídeos G e C ($\geq 55\%$) e uma razão na qual os dinucleotídeos CpG observado / esperado é de pelo menos 60%. No genoma margeando as ilhas CpGs existem as *shores* e as *shelves*. As duas regiões possuem uma baixa densidade de CpG, sendo que a primeira é localizada a 2 kb de uma ilha de CpG e a segunda 4kb. Outras terminologias relacionadas à metilação são *open sea* (regiões com poucos ou nenhum dinucleotídeo CpG) e corpo do gene (local do início ao fim da transcrição) (Figura 4B) (Asmar *et al.*, 2015). Os dinucleotídeos CpG correspondem a uma pequena porção do genoma (2-5%) e não são distribuídos de forma aleatória (Lopez *et al.*, 2009). CpGs são encontrados principalmente em sequências repetitivas, como nos SINEs e LINEs (do inglês *short interspersed nuclear elements* e *long interspersed nuclear elements*), nas regiões promotoras e no primeiro éxon dos genes (Cohen *et al.*; Lopez *et al.*, 2009). A adição do radical metil à citosina impede a ligação de fatores de transcrição, silenciando a transcrição gênica, que é um mecanismo natural de regulação da transcrição.

Em células normais, SINE e LINE são hipermetiladas enquanto a região promotora de genes fundamentais para o funcionamento celular são hipometilados. Durante a carcinogênese, ocorrem mudanças características no perfil de metilação do DNA como hipometilação genômica global e a hipermetilação de promotores (Herman and Baylin, 2003; Jiang *et al.*, 2013). Células malignas possuem de 20 a 60% menos 5-metilcitosina do que células normais, essa condição promove instabilidade genômica, causando desregulação dos cromossomos durante a divisão celular e a ativação indesejada de elementos transponíveis no genoma, levando a mais danos genéticos (Locke *et al.*, 2019). A hipermetilação dos promotores de genes supressores de tumor é um evento precoce na formação do tumor, aumentando progressivamente ao longo do processo carcinogênico e contribuindo para a aquisição do fenótipo maligno (Baylin and Herman, 2000). A metilação de um único supressor de tumor pode

ser ocasionalmente encontrada em lesões benignas, contudo a metilação de múltiplos genes supressores de tumor é um marcador confiável de malignidade (Pfeifer, 2018). Ainda que certos padrões de metilação sejam compartilhados por alguns tumores, a hipermetilação das ilhas CpG varia de acordo com cada tipo e estágio tumoral, de forma que cada subtipo apresenta uma assinatura, que pode ser exclusiva da neoplasia, como acontece com marcadores genéticos e citogenéticos (Pfeifer, 2018).

Adicionalmente, a hipermetilação no corpo do gene pode possuir um efeito modulador importante na regulação transcricional. A metilação no corpo do gene promove o silenciamento de promotores alternativos, conferindo mudanças na expressão de isoformas do mesmo e confere níveis mais altos de expressão gênica (Pfeifer, 2018).

3.1.1. Metilação do DNA em carcinomas periampulares

A exceção do ADP, as informações acerca do *status* de metilação dos carcinomas periampulares são muito limitadas, tendo como o foco um ou poucos genes relacionados à carcinogênese.

Kim et al., (2003) realizou uma análise comparativa do perfil de metilação em uma pequena série de casos de CPs comparado ao tecido duodenal e biliar adjacente (carcinoma de ampola de Vater= 9, colangiocarcinoma distal= 18 e adenocarcinoma duodenal=12) em 13 genes associados ao câncer. No estudo; os genes *p16*, *p14*, *MLH1*, *MGMT*, *MINT1*, *MINT25*, *MINT27* e *ER* foram metilados com maior frequência em adenocarcinomas duodenais em comparação com a mucosa duodenal não neoplásica. O perfil de metilação dos colangiocarcinoma distal e carcinoma de ampola de Vater foram comparados com o tecido biliar adjacente. Níveis aumentados de metilação foram encontrados para o gene *p16* nas duas neoplasias, enquanto que *RARβ* e *ER* foram hipermetilados exclusivamente nos colangiocarcinomas distais e carcinomas de ampola de Vater, respectivamente (Kim et al., 2003). A hipermetilação de genes envolvidos na carcinogênese gastrointestinal (*hMLH1*, *HPP1*, *p14*, *p16* e *APC*) são frequentes no adenocarcinoma duodenal (Brücher et al., 2006), bem como a metilação do gene *MGMT*, um dos componentes

do sistema de reparo do DNA. A metilação de *MGMT* foi associada a um mal prognóstico em pacientes com adenocarcinoma duodenal em estágio avançado da doença (Fu *et al.*, 2016)

Especificamente para os carcinomas de ampola de Vater, há uma grande dificuldade de comparar os níveis de metilação do tumor, visto que quando o mesmo se estabelece na pequena região da ampola de Vater, o epitélio normal raramente é preservado. Usando amostras de tecido ampular normal obtidos de autópsia Tozawa *et al.* (2004) identificou hipermetilação nos genes *CHFR*, *DAPK1*, *CDH1*, *p16*, *RASSF1A* e *RUNX3* nos tumores (Tozawa *et al.*, 2004) .

Em tumores pancreáticos, a alteração do perfil de metilação do DNA é notoriamente marcante em comparação com células pancreáticas normais (Delpu *et al.*, 2011). A hipometilação global do DNA e a hipermetilação de ilhas CpG de vários promotores gênicos que ocorre nesse tumor, também é característico a vários tumores como mama, esôfago e gástrico (Ehrlich, 2009). Muitas dessas alterações ocorrem desde o início da carcinogênese pancreática, nas NIPans, como a inativação por metilação do gene supressor de tumor *CDKN2A* (p16) e do gene *ppENK*, relacionado ao crescimento celular na carcinogênese pancreática (Fukushima *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2015). Os níveis de metilação de *ppENK* aumentam progressivamente conforme a progressão das lesões precursoras (Fukushima *et al.*, 2002). Alguns outros genes, como *SPARC*, *TSLC1*, *TFPI-2*, *BRCA1*, *APC*, *CDKN2A* e *TIMP3* já foram identificados hipermetilados em carcinomas pancreáticos, sendo alguns deles metilados em até 90% dos casos analisados (Peng *et al.*, 2006; Brune *et al.*, 2008) . O avanço tecnológico de análises genômicas ampliou o conhecimento a respeito da correlação entre os níveis de metilação e expressão gênica. Um dos primeiros estudos com esse enfoque identificou que alguns oncogenes (*MYB*, *JUNB* e *FOS*) e modificadores cromatina (*SET8*, *KDM6A* e *EP400*) eram modulados por metilação no ADP (Vincent, Omura, *et al.*, 2011). Genes relacionados a agressividade tumoral como *MYB* (responsável pelo crescimento celular, invasão, metástase, e modificação e *splicing* do RNA) (Vincent, Omura, *et al.*, 2011), relacionados a adesão celular (*PCDH1*, *PCDH10*, *CDH2* e *CDH4*), sinalização WNT (*SOX1*, *APC2* e *WNT5A*) e

pluripotência (*BMP3*, *FOXD3* e *BMI1*) foram reportados ao longo dos anos como diferentemente metilados nas neoplasias pancreáticas (Vincent, Omura, *et al.*, 2011). Um estudo com 167 amostras de ADP identificou que a metilação afeta vias-chave da carcinogênese pancreática, tais como TGF- β , Wnt, e sinalização de orientação do axônio (Nones *et al.*, 2014).

3.2. Modificações nas Histonas

O estado de agregação do nucleossoma, estrutura composta por DNA e proteínas básicas denominadas histonas, é o que regula a organização nuclear nas células eucariotas. O nucleossoma também pode ser denominado unidade básica da cromatina e é formado pelas histonas H2A, H2B, H3 e H4, as quais formam um complexo que, por sua vez, se dimeriza a um complexo igual, formando um octâmero proteico em torno do DNA (Figura 5) (Luger *et al.*, 1997; Schneider, G. *et al.*, 2011).

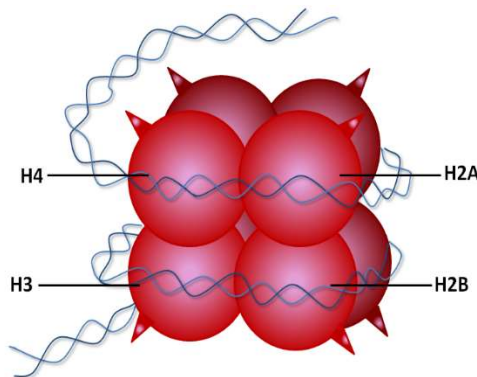


Figura 5. Estrutura do nucleossoma. Dupla hélice de DNA de 146 pb envolve esta estrutura (figura elaborada pela autora).

O domínio N-terminal das histonas pertencentes ao octâmero se estende para fora do nucleossoma, o que permite a acessibilidade de complexos reguladores epigenéticos que podem adicionar ou retirar moléculas covalentes a essas proteínas. A alteração da conformação do nucleossoma é mediada por essas alterações e tem como resultado final a modificação da acessibilidade das maquinarias de reparo, replicação e transcrição (Lee *et al.*, 1993; Peterson and Laniel, 2004; Groth *et al.*, 2007; Mazzi and Soliman, 2012). As modificações pós-traducionais das histonas incluem: a

acetilação de lisinas, a metilação de lisinas e argininas, a fosforilação de serinas e treoninas, a adenosina difosfato-ribosilação de ácido glutâmico e a ubiquitinação e sumoilação de resíduos de lisina, entre outros (Lomberk and Urrutia, 2015). Atualmente, a modificação ativa no processo transcricional mais estudada é a acetilação dos resíduos de lisina das histonas 3 e 4 (H3 e H4), que levam à formação da eucromatina (Li *et al.*, 2007).

O processo de modificação das histonas por acetilação é dependente de dois grupos de enzimas: as acetilases de histonas (do inglês *histone acetyltransferases*, HATs) e as HDACs. HATs promovem a acetilação em resíduos de lisina nas histonas H3 e H4 e conferem a ativação da molécula de cromatina (eucromatina), permitindo que a cromatina fique acessível para a ação dos fatores de transcrição (FT). Por outro lado, a ação das HDACs consiste na remoção dos radicais acetil do aminoácido lisina nas histonas H3 e H4, o que impede o acesso dos FTs à cromatina, inativando-a (heterocromatina), como mostrado na Figura 6 (Brown *et al.*, 2000; Schneider, G. *et al.*, 2011).

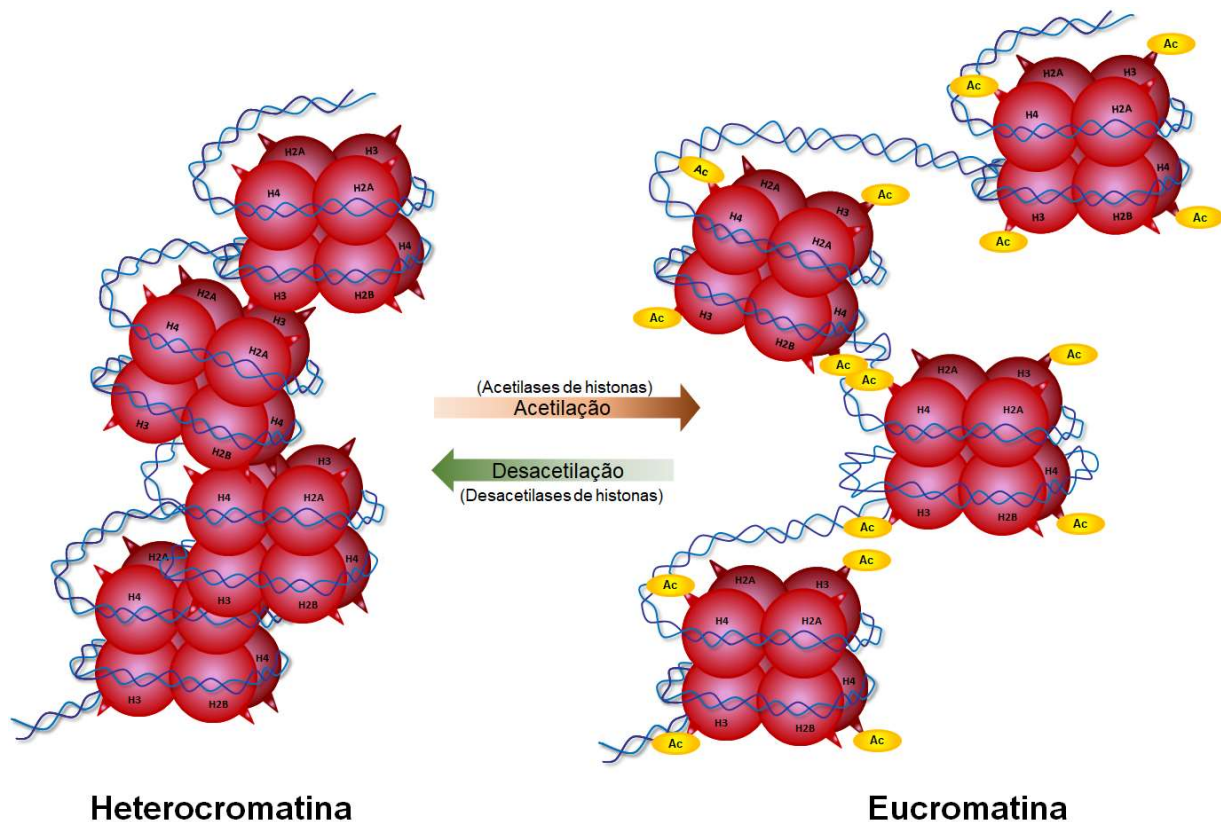


Figura 6. Transição entre eucromatina e heterocromatina mediada pelas acetilases de histonas (HATs) e desacetilases de histonas (HDACs). HATs acetilam os resíduos H3 e H4 das histonas modificando a afinidade destas com o DNA e permitindo maior acessibilidade de proteínas ao DNA (eucromatina). A remoção dos grupos acetil mediada pelas HDACs restaura a afinidade basal das estruturas (heterocromatina)(figura elaborada pela autora).

A família das HDACs apresenta quatro classes que diferem em relação à sua homologia no sítio catalítico, sendo classificadas de I a IV (Figura 7). As classes I, II e IV usam o íon zinco para a hidrólise do grupo acetil, enquanto a classe III (ou sirtuínas, SIRT), é dependente da presença do cofator metabólico NAD^+ para promover a desacetilação e liberação do grupo acetil (Gregoretti *et al.*, 2004; Ekwall, 2005). A classe I é composta pelas HDACs 1, 2, 3 e 8 e a classe II é subdividida em classe IIa composta pelas HDACs 4, 5, 7, 9 e 10 (que possuem apenas um domínio catalítico); e classe IIb composta pelas HDACs 6 e 10 (que possui dois domínios catalíticos). A classe III é representada pelas SIRTs1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; e a classe IV possui apenas

um representante, a HDAC11 (Grozinger and Schreiber, 2002; Yang and Seto, 2008; Schneider, G. *et al.*, 2011).

Classe	Isoforma	Subunidade Catalítica	Cofator	Localização Celular	Expressão	Domínio Catalítico
I	HDAC1	RPD3	Zn ⁺⁺	Nuclear	Ubíqua	
	HDAC2			Nuclear		
	HDAC3			Nuclear e Citoplasmática		
	HDAC8			Nuclear		
IIa	HDAC4	HDA1	Zn ⁺⁺	Nuclear e Citoplasmática	Específica	
	HDAC5			Nuclear e Citoplasmática		
	HDAC7			Nuclear e Citoplasmática		
	HDAC9			Nuclear e Citoplasmática		
IIb	HDAC6	HDA2	Zn ⁺⁺	Nuclear e Citoplasmática	Específica	
	HDAC10			Nuclear e Citoplasmática		
III	SIRT1	Sir2	NAD ⁺	Nuclear	Variável	
	SIRT2			Citoplasmática		
	SIRT3			Mitocondrial		
	SIRT4			Mitocondrial		
	SIRT5			Mitocondrial		
	SIRT6			Nuclear		
	SIRT7			Nuclear		
IV	HDAC11	RPD3/HDA1	Zn ⁺⁺	Nuclear	Ubíqua	

Figura 7. Classes de desacetilases de histonas (adaptado de Schneider, A. *et al.*, 2011; Shirakawa *et al.*, 2013).

As HDACs ainda atuam removendo grupos acetil de proteínas não-histonas como fatores de transcrição (E2F, p53, c-Myc, NF-κB), chaperonas (HSP90), mediadores da sinalização (Stat3, Smad7), proteínas de reparo (Ku70), α-tubulina, β-caderina, retinoblastoma (pRb), fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1α), receptor de estrogênio, receptor andrógeno, MyoD, chaperonas (HSP90), mediadores da sinalização (Stat3, Smad7), proteínas de reparo (Ku70), exercendo efeitos diretos em vários processos biológicos (Figura 8) (West and Johnstone, 2014) .

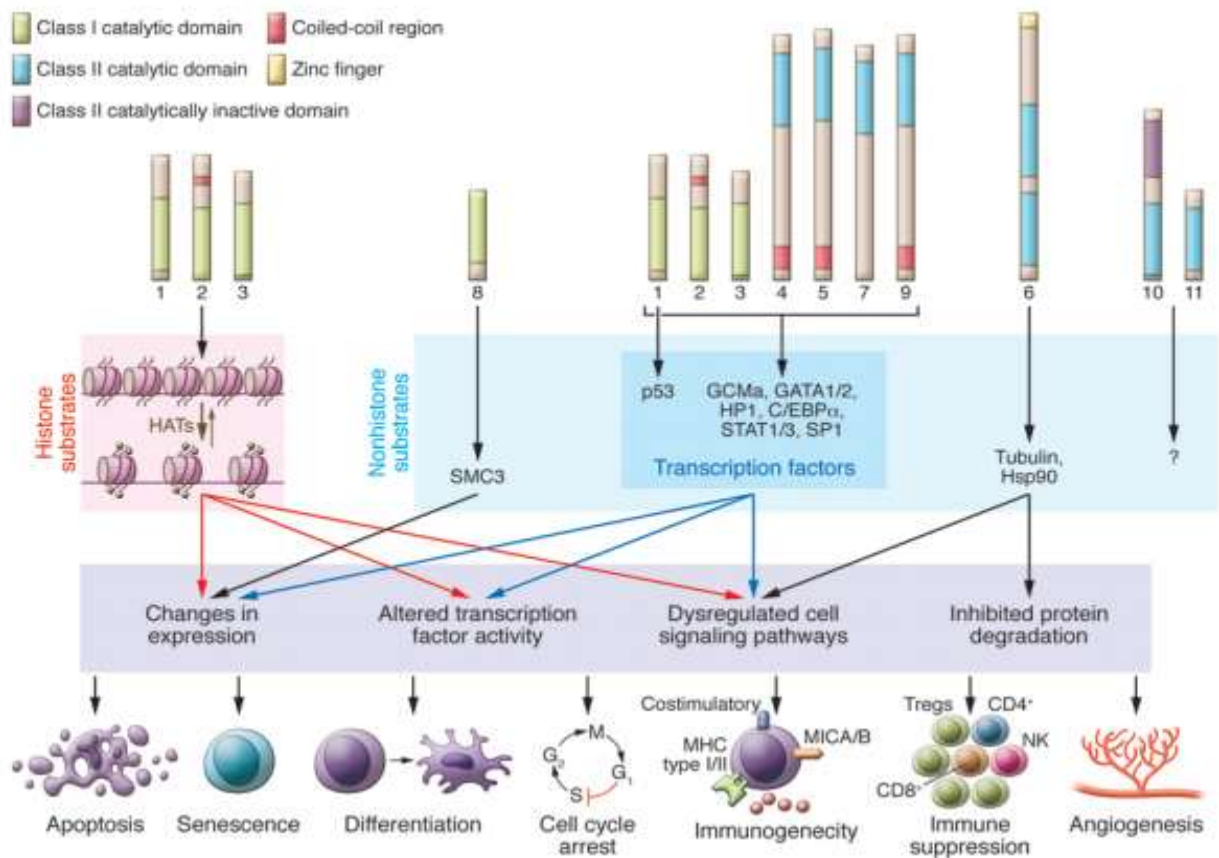


Figura 8. Consequências biológicas da desacetilação de proteínas (West and Johnstone, 2014).

3.2.1. Desacetilases de histonas em carcinomas periampulares

O papel das HDACs no desenvolvimento e controle de neoplasias tem chamado à atenção de muitos estudos, uma vez que a superexpressão das mesmas pode resultar no impedimento da transcrição de genes ligados a vias fundamentais para a carcinogênese (Bi and Jiang, 2006; Haberland *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2010; West and Johnstone, 2014). A expressão aumentada das HDACs é frequentemente observada em várias neoplasias sólidas e hematológicas, como câncer de mama, ovário, colorretal e pâncreas (Sanaei and Kavosi, 2019).

A proliferação e manutenção do ADP envolvem HDACs de classes I e II. A classe I desempenha um papel predominante na carcinogênese (Singh *et al.*, 2016). Várias HDACs, como HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC7, foram superexpressas nas

linhagens celulares e amostras teciduais do ADP (Fritsche *et al.*, 2009; Lehmann *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Ouaïssi *et al.*, 2014) . Entre os mecanismos caracterizados envolvendo as HDACs no ADP destacam-se: 1) Controle da proliferação celular, HDACs controlam a expressão de p21, p27 e ciclina B1 modulando a fase G1 / S ou G2 / M ou o ciclo celular; 2) Inibição a apoptose, HDACs contribuem para a expressão desequilibrada dos genes anti-apoptótico (*BCL-W*, *MCL1*, *BCL-XL* e *c-FLIP*) e pró-apoptótico (*BIM*, *BAX* e *NOXA*); e 3) Metástase, HDAC1 e 2 reprimem a expressão de E-caderina, favorecendo a transição epitélio- mesenquimal (Sanaei and Kavooosi, 2019). A tabela 4 apresenta um resumo das principais características dessas proteínas nos tumores pancreáticos.

Quadro 2. Expressão e consequência biológica das HDACs no ADP.

HDAC	Expressão	Consequência	Referência
HDAC1	Superexpressão	Alta atividade proliferativa, pior sobrevida	Miyake <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2009; Bosman <i>et al.</i> , 2010; Sanaei and Kavooosi, 2019
HDAC2	Superexpressão	Correlação com pior grau de diferenciação do tumor, modula a resistência à apoptose	Fritsche <i>et al.</i> , 2009; Lehmann <i>et al.</i> , 2009
HDAC3	Superexpressão	Envolvida no controle da transição epitélio mesenquimal, metástase, proliferação celular	Lehmann <i>et al.</i> , 2009; Jiao <i>et al.</i> , 2014; Sanaei and Kavooosi, 2019
HDAC6	Superexpressão	Protege as células tumorais da apoptose, ajudando a reduzir a quantidade intercelular de proteínas mal dobradas	Klieser <i>et al.</i> , 2015; Sanaei and Kavooosi, 2019
HDAC7	Superexpressão	Media negativamente atividades antiproliferativas e condução da apoptose	Ouaïssi <i>et al.</i> , 2008; Ouaïssi <i>et al.</i> , 2014; Cai <i>et al.</i> , 2018

Atualmente não há relatos da expressão das HDACs no adenocarcinoma duodenal e para os outros carcinomas periampulares as informações acerca de sua expressão são muito limitadas. As HDACs foram melhores caracterizadas nos colangiocarcinomas, contudo a maior parte dos estudos aborda os colangiocarcinomas intra-hepáticos ou não especifica a classificação tumoral do colangiocarcinoma estudada (Yamaguchi *et al.*, 2010; Morine *et al.*, 2012;

Sriraksa and Limpai boon, 2013; He *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2017). He *et al.*, avaliou a expressão gênica da classe I e II das HDACs por qRT-PCR em 26 colangiocarcinomas (de origem não especificada) comparados com tecidos não tumorais adjacentes. No estudo, os autores encontraram superexpressão das *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8* e *HDAC9* nos tumores e investigação proteica confirmou a superexpressão das HDAC2, HDAC3 e HDAC8. Adicionalmente, a alta expressão das HDAC2 e HDAC3 foi correlacionada com comprometimento de linfonodos, pior estadiamento e grau de diferenciação (He *et al.*, 2016). O carcinoma neuroendócrino de células grandes é um carcinoma neuroendócrino de alto grau, originalmente descrito no pulmão. O tumor raramente ocorre em locais extrapulmonares como o trato gastrointestinal, e apenas alguns exemplos foram descritos na ampola de Vater. A expressão das HDAC1, HDAC2 e HDAC3 foi investigada nesse subtipo histológico raro de carcinoma da ampola de Vater em combinação com uma série de marcadores imunohistoquímicos para a caracterização do tumor e avaliação da agressividade. Os níveis de expressão foram cerca de 60% para todas as HDAC analisadas (Stojacic *et al.*, 2010).

CAPÍTULO II: JUSTIFICATIVA

Carcinomas periampulares são neoplasias raras que podem ter quatro origens teciduais distintas, com perfil de agressividade variado. Tumores pancreáticos são os mais frequentes entre os carcinomas periampulares e estes têm as piores taxas de mortalidade. Especificamente para o ADP, até o momento, pouquíssimas estratégias terapêuticas tem demonstrado um efeito significativo na sobrevida em virtude de fatores intrínsecos da neoplasia, da sintomatologia inespecífica da doença, e de limitações metodológicas relacionadas aos exames de diagnóstico. Desta forma, a descoberta de novos biomarcadores para diagnóstico precoce, desenvolvimento de novas terapias direcionadas a alvo e definição de prognóstico são necessidades urgentes.

Em relação aos outros tumores periampulares, as informações genéticas e epigenéticas ainda são limitadas, tanto a respeito da sua biologia tumoral como seu prognóstico. Ao que nos consta, o perfil de desacetilases de histonas nunca foi investigado em adenocarcinomas duodenais e nos carcinomas de ampola de Vater informações são muito escassas. Considerando que vários estudos têm abordado o papel de alterações epigenéticas no processo de carcinogênese e na resposta a tratamentos anti-neoplásicos de outros tumores, a caracterização de mecanismos epigenéticos dos carcinomas periampulares pode fornecer embasamento para essas abordagens terapêuticas. Considerando que alguns aspectos moleculares importantes desses tumores ainda precisam ser esclarecidos, essa tese propôs, entre outros objetivos, sanar dúvidas relevantes sobre características epigenômicas e genômicas dos tumores periampulares, contribuindo para um melhor entendimento da carcinogênese destes tumores e contribuindo com informações para identificação de novos marcadores prognósticos.

CAPÍTULO III: OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular do adenocarcinoma ductal pancreático e de tumores periampulares com o objetivo de contribuir para melhor compreensão do processo de carcinogênese e identificar marcadores prognósticos relacionados a esses tumores.

Objetivos específicos

1. Caracterizar o perfil de metilação do DNA do adenocarcinoma ductal pancreático em busca de potenciais alvos terapêuticos nas vias moleculares associadas à carcinogênese destes tumores.

2. Avaliar a correlação entre o perfil de metilação do DNA e o perfil de expressão gênica do adenocarcinoma ductal pancreático e investigar possíveis biomarcadores prognósticos.

3. Caracterizar o perfil de expressão das desacetilases de histonas *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC7* em tumores periampulares em especial no adenocarcinoma de ampola de Vater.

4. Descrever uma apresentação incomum de múltiplos tumores periampulares em um paciente com neurofibromatose tipo 1 e as potenciais correlações genótipo-fenótipo existentes.

CAPÍTULO IV: Manuscrito 1

“Pancreatic Ductal Adenocarcinoma methylome analysis identifies differentially methylated genes in the Calcium signaling pathway and early methylation alterations”

Manuscrito a ser submetido à revista *Cancers* (Fator de impacto: 6,1).

CAPÍTULO V: Manuscrito 2

“Histone deacetylase expression profile in periampullary carcinomas: a preliminary study based on public datasets and clinical samples”

Manuscrito submetido à revista *Molecular Biology Reports* (Fator de impacto: 2,1).

CAPÍTULO VI: Manuscrito 3

Pancreas divisum, multiple gastrointestinal tumors and the co-occurrence of two germline pathogenic variants: unusual presentation in a neurofibromatosis type 1 patient”.

Manuscrito submetido à revista *Frontiers in Genetics* (Fator de impacto: 3,5).

CAPÍTULO VII: DISCUSSÃO

Os tumores pancreáticos são extremamente agressivos e notadamente apresentam mal prognóstico, mesmo o adenocarcinoma ductal pancreático (ADP, tipo tumoral mais estudado) apresenta oportunidades limitadas de tratamento. Tumores mais raros, como os outros carcinomas periampulares, também possuem altas taxas de mortalidade e para estes, há menos estudos que possam embasar terapias inovadoras e modificar significativamente a sobrevida. Desta forma, a busca por novos biomarcadores e alterações moleculares em vias de sinalização pode favorecer o entendimento da biologia tumoral e poderá permitir o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas.

No manuscrito do capítulo IV, a caracterização do perfil de metilação do DNA em ADP foi realizada em busca de potenciais alvos terapêuticos em vias moleculares associadas à carcinogênese. A plataforma de metilação utilizada neste trabalho (*Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit, Illumina*) é capaz de interrogar 99% dos genes humanos e discriminar padrões de metilação em dinucleotídeos CpG e sua relação com genes e ilhas CpG (Bibikova *et al.*, 2011). Nesta análise, observou-se que os tumores eram predominantemente hipermetilados em comparação às amostras de tecido pancreático normal adjacentes ao tumor (PanN) e que a maioria das sondas hipermetiladas estava localizada nas Ilhas CpG e em promotores gênicos. Esse perfil é comumente observado em várias neoplasias e já foi descrito em trabalhos prévios analisando ADPs com a mesma metodologia (Nones *et al.*, 2014; Mishra & Guda, 2017).

Usando as informações de metilação obtidas na plataforma, investigamos novas vias diferencialmente metiladas e potencialmente associadas à carcinogênese. Observamos que a via de sinalização de Cálcio (Ca^{+2}) apresentava vários genes diferencialmente metilados que tinham interações com vias importantes da carcinogênese pancreática (como por exemplo, as vias de sinalização Ras e Hippo). A via de sinalização de Ca^{+2} atua em diferentes processos biológicos, incluindo regulação do ciclo celular, sobrevivência, apoptose, migração e regulação da expressão gênica (Berridge *et al.*, 2000). Alterações desta via já foram descritas em

outras neoplasias sólidas e regulação positiva ou negativa dos seus genes pode promover a proliferação, migração e metástase (Monteith *et al.*, 2007; Monteith *et al.*, 2012). Um estudo recente e importante foi o de Wang *et al.*, que avaliou o status de metilação do DNA e sua associação com expressão gênica em doze tumores sólidos. A via de sinalização do Ca^{+2} foi descrita como uma das principais vias desreguladas por metilação em nove tumores (mama, bexiga, cólon, cabeça e pescoço, rim, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma escamoso de pulmão e útero). Alguns genes silenciados epigeneticamente codificavam proteínas chave da via de sinalização do cálcio como os trocadores $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ e receptores acoplados à proteína G (Wang *et al.*, 2017).

Para aprofundar a análise desta via, a disponibilidade de informações de expressão gênica, metilação e sobrevida do consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) nos permitiu investigar o impacto da metilação sobre a expressão dos genes da via do Ca^{+2} , bem como fazer inferências sobre o seu valor prognóstico. Observamos que 112 sondas apresentavam correlação significativa entre os perfis de metilação e expressão gênica; e entre estas, todas aquelas localizadas nas regiões promotoras apresentavam claramente correlação inversa com a expressão, ao contrário das sondas nos corpos dos genes, em que a correlação entre metilação e expressão gênica foi variável.

Posteriormente, avaliamos o valor prognóstico da expressão de 32 genes (correspondentes às 112 sondas) da via de sinalização do cálcio. Verificamos que os níveis de expressão de dez genes estavam associados com sobrevida dos pacientes com ADP. Pacientes com expressão diminuída dos genes *ADCY8*, *CACNA1A*, *CACNA1B*, *CACNA1D*, *CACNA1H*, *ORAI2*, *PDE1C*, *PLCB1* e *RYR3* apresentavam redução da sobrevida global, enquanto que a expressão diminuída do gene *HRH1* foi associada a maior sobrevida. Dos 10 genes avaliados, apenas os genes *PDE1C*, *PLCB1* e *ADCY8* codificam proteínas citoplasmáticas, os demais genes codificam proteínas que controlam o influxo de Ca^{+2} da membrana plasmática no retículo endoplasmático rugoso. Outros estudos demonstraram que os canais ou bombas de

Ca²⁺ são alvos terapêuticos em potencial em diferentes subtipos de câncer e estão correlacionados com o prognóstico (Monteith *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Raynal *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). No ADP, poucos estudos investigaram o papel das proteínas da via de sinalização do Ca²⁺, principalmente em relação ao controle epigenético mediado pela metilação do DNA de seus genes. O perfil de metilação do gene *S100A4*, que codifica uma proteína de ligação ao Ca²⁺ relacionada ao comportamento metastático (Boye and Maelandsmo, 2010), foi avaliado em amostras de ADP e linhagens celulares (Rosty *et al.*, 2002). Os autores detectaram hipometilação do gene nos tumores, e também associaram os níveis de metilação a um pior grau de diferenciação tumoral. Usando dados do TCGA, Mishra *et al.* analisaram o perfil de metilação do DNA em amostras de ADP, embora os genes da via de sinalização de Ca²⁺ ocupassem a quarta posição no enriquecimento funcional das sondas diferencialmente metiladas, esse achado não foi explorado (Mishra & Guda, 2017).

Embora o estudo não tenha sido elaborado com essa finalidade, identificamos padrões desregulados de metilação do DNA em PanN. Ao realizar a clusterização não supervisionada das amostras, verificamos que três PanN apresentavam um perfil de metilação muito semelhante ao ADP em uma pequena parcela das sondas. As amostras foram verificadas em relação ao seu percentual de células normais (> 80%) e apresentaram apenas pequenas regiões de fibrose, sem nenhuma evidência de contaminação celular neoplásica, sugerindo que essas alterações podem ocorrer precocemente na transformação das células pancreáticas, antes mesmo de se observar alteração morfológica identificável por análise histopatológica. Tais alterações podem ser atribuídas ao fenômeno do campo de cancerização, conjunto de alterações genéticas e epigenéticas que indicam que uma área específica do tecido normal está passando por um processo de transformação neoplásica ou tem predisposição para iniciar esse processo, o que pode ocorrer sem alterações morfológicas evidentes (Curtius *et al.*, 2018). A análise específica dessas sondas revelou 23 genes diferencialmente metilados envolvidos na via de sinalização do cálcio

sugerindo que esta via de sinalização pode estar alterada desde etapas muito iniciais da carcinogênese do ADP.

Sendo assim, os resultados deste estudo indicam um papel importante da via de sinalização do cálcio desde cedo no processo de carcinogênese do ADP e abrem uma oportunidade promissora para estudos de pesquisa adicionais. Será importante ampliar e replicar o estudo atual, preferencialmente com um maior número de amostras para confirmar os achados em diferentes estágios do desenvolvimento do ADP.

Quanto aos carcinomas periampulares, as informações genéticas e epigenéticas ainda são limitadas, tanto em relação da sua biologia tumoral como história natural da doença considerando as diferentes origens teciduais. As análises realizadas nessa tese tiveram como objetivo inicial contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de carcinogênese implicados nestes tumores. Neste contexto, a acessibilidade ao DNA mediada pelas desacetilases de histonas poderia ter um papel importante na regulação epigenética dos mesmos. As HDACs atuam modulando a expressão dos genes e removendo grupos acetil de proteínas não-histonas como por exemplo fatores de transcrição, exercendo efeitos diretos em vários processos biológicos (West & Johnstone, 2014). Em neoplasias, as HDACs atuam na indução da transcrição de genes-chave que regulam funções celulares importantes, como proliferação celular, regulação do ciclo celular e apoptose (Ropero & Esteller, 2007). Adicionalmente, inibidores de desacetilases de histonas (HDACi) são uma nova classe de fármacos anti-câncer que tem sido utilizada como terapia complementar à convencional para melhorar o prognóstico de doenças neoplásicas como o ADP (Lakshmaiah *et al.*, 2014). Entre as avaliações iniciais para investigar o potencial terapêutico de um novo agente quimioterápico está a verificação se o seu alvo molecular é expresso. Assim, obter mais informações sobre a expressão das HDACs em CP é um primeiro passo para avaliar se estas proteínas são relevantes no processo de carcinogênese. No manuscrito do capítulo V, caracterizamos o perfil de expressão das desacetilases de histonas HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC7 em carcinomas

periampulares, bem como investigamos o possível papel das mesmas no desenvolvimento dos carcinomas de ampola de Vater. Utilizamos bancos de dados de expressão para avaliar o perfil das HDACs e segundo nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a avaliar a sua expressão no adenocarcinoma duodenal. Os carcinomas de ampola de Vater e os adenocarcinomas duodenais apresentaram um perfil de expressão semelhante para as *HDAC1* e *HDAC2*. Provavelmente porque ambos os tecidos apresentam a mesma origem embrionária e o epitélio da ampola de Vater é formado por células com o perfil intestinal (Kimura *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2013; Yachida *et al.*, 2016). Esse trabalho ainda avaliou, pela primeira vez, a caracterização proteica das HDACs em amostras de adenocarcinoma de ampola de Vater (o subtipo histológico mais frequente), e tecidos normais adjacentes (pancreático, ampular e duodenal). O único relato prévio de expressão de desacetilases de histonas no carcinoma de ampola de Vater era de um subtipo tumoral raro (carcinoma neuroendócrino de alto grau) (Stojisic *et al.*, 2010). Encontramos um perfil de expressão muito semelhante para todos os tecidos analisados, sugerindo que *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC7* não estão diretamente envolvidas no desenvolvimento dos carcinomas de ampola de Vater.

Ainda em relação aos carcinomas periampulares, estes tumores não são incomuns em pacientes com neurofibromatose tipo 1 (NF1), um dos distúrbios autossômicos dominantes mais prevalentes (Cimino & Gutmann, 2018). Anomalias do desenvolvimento, como pâncreas *divisum*, foram descritas em pacientes com NF1 e com tumores periampulares e, na maioria deles o diagnóstico foi incidental, sem relação causal aparente da alteração molecular observada na doença (perda de função do gene *NF1*) com o desenvolvimento de neoplasias pancreáticas (Waisberg *et al.*, 2006; Bhandari *et al.*, 2015). No manuscrito do capítulo VI, descrevemos uma apresentação incomum de um paciente com NF1, pâncreas *divisum*, múltiplos tumores gastrointestinais e a co-ocorrência de duas variantes patogênicas na linhagem germinativa (*NF1* e *CFTR*). Este caso é particularmente interessante porque a paciente apresentava dois sistemas ampulares devido ao pâncreas *divisum* e três neoplasias primárias, duas delas tumores ampulares (adenocarcinoma e tumor

neuroendócrino) e um tumor estromal gastrointestinal (GIST). Por conta desta apresentação, foi realizada uma investigação com painel de múltiplos genes relacionados a neoplasias endócrinas e exócrinas do pâncreas. Pacientes com NF1 tem uma predisposição para neoplasias neuroendócrinas pancreáticas e ampulares em especial GIST, entretanto a ocorrência de adenocarcinomas não é comum (Gutmann *et al.*, 1997; Relles *et al.*, 2010; Guilmette & Nosé, 2019). O outro fator de risco para câncer de pâncreas identificado nesta paciente é a presença de uma variante patogênica em heterozigose no gene *CFTR*. O mecanismo de associação de risco de *CFTR* com câncer de pâncreas não é direto, mas sim, indireto, pois em pacientes com variantes patogênicas, pancreatites recorrentes são comuns. A pancreatite, por sua vez, é um dos fatores de risco para neoplasias pancreáticas mais estabelecidos (Raimondi *et al.*, 2010; Kirkegård *et al.*, 2017) e nos casos com etiologia hereditária geralmente cursa com a presença de variantes patogênicas nos genes *PRSS1*, *SPINK1* ou *CFTR* (Zhan *et al.*, 2018; Lee & Papachristou, 2019). Surpreendentemente, a paciente não apresentava história prévia de pancreatite, o que é curioso, pois além de apresentar uma variante patogênica em *CFTR*, a paciente possuía outra característica que favorece o desenvolvimento de pancreatite, o pâncreas *divisum*. Essa malformação pancreática atua como um modulador de risco em portadores das variantes patogênicas (Bertin *et al.*, 2012; Hegyi *et al.*, 2016). Embora não exista relato de sintomas ou claro diagnóstico de pancreatite prévia, a ocorrência de pancreatite subclínica não pode ser descartada. Fica também a dúvida em relação a um efeito combinado das duas variantes patogênicas sobre a predisposição aumentada para desenvolvimento de carcinomas periampulares, que poderia ser melhor estudada em modelos experimentais ou nos próprios tecidos tumorais da paciente. Sendo assim, é possível que a identificação de duas variantes germinativas patogênicas possa explicar o fenótipo incomum e mais grave observado na paciente. Este caso ressalta a importância de análises moleculares abrangentes em pacientes com fenótipos complexos, como a presença de múltiplos tumores primários em combinação com anomalias do desenvolvimento.

CAPÍTULO VIII: CONCLUSÕES

Considerando os resultados encontrados no presente estudo, podemos concluir que:

a. O adenocarcinoma ductal pancreático apresenta genes diferencialmente metilados em relação ao tecido normal adjacente. Entre outros achados, os dados obtidos no presente estudo indicaram que a via de sinalização do cálcio está alterada por esse processo epigenético, e muitos de seus genes são compartilhados com vias chave da carcinogênese pancreática, como as vias Ras e Hippo. Os genes *CACNA1A*, *CACNA1B*, *CACNA1H*, e *RYR3*; que controlam o influxo de Ca^{+2} da membrana plasmática no retículo endoplasmático rugoso estavam mais frequentemente hipermetilados, a redução da expressão desses genes se mostrou associada à redução da sobrevida global nos pacientes. Este achado é relevante, pois pode indicar potenciais alvos terapêuticos para casos selecionados de ADP. Adicionalmente, os dados indicam que a via de sinalização do cálcio parece ter um papel importante desde as etapas muito iniciais da carcinogênese pancreática.

b. A análise de expressão de desacetilases de histonas, embora deva ser considerada uma análise preliminar, indica que os carcinomas de ampola de Vater e os adenocarcinomas duodenais apresentam perfil de expressão semelhante para *HDAC1* e *HDAC2*. Ainda, os adenocarcinomas de ampola de Vater e tecidos não tumorais adjacentes apresentam também um perfil de expressão semelhante para as *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3* e *HDAC7*. Estes resultados sugerem que as desacetilases de histonas não estão diretamente envolvidas na carcinogênese de tumores da ampola de Vater, embora possam ter um papel auxiliando o fenótipo tumoral, modulando genes envolvidos proliferação celular, regulação do ciclo celular e apoptose.

c. Mediante descrição de um caso clínico apresentamos um exemplo de um caso complexo, com fenótipo atípico e mais grave de neurofibromatose 1 onde a presença de duas variantes germinativas patogênicas

em genes distintos (*NF1* e *CFTR*) relacionados a doenças envolvendo o pâncreas podem ter agido sinergicamente. Em especial, a variante germinativa patogênica do gene *CFTR* associada ao pâncreas *divisum* podem ter contribuído para a ocorrência de múltiplos tumores na paciente portadora de Neurofibromatose tipo 1. Este relato de caso reforça a importância de uma análise molecular mais abrangente, incluindo avaliação de múltiplos genes relacionados ao fenótipo em casos atípicos ou com fenótipo mais grave que o habitual. A informação obtida no estudo de caso será também muito relevante para os familiares do caso índice.

Em suma, os resultados desta tese contribuem para o melhor entendimento do perfil genético e epigenético dos adenocarcinomas ductais pancreáticos e de carcinomas periampulares. Os resultados também indicam importantes linhas de investigação para explorar melhor novas vias de sinalização que possam trazer informações relevantes para o desenvolvimento de biomarcadores prognósticos e novas estratégias terapêuticas.

CAPÍTULO IX: PERSPECTIVAS

Como perspectivas à continuidade desse trabalho, estão as seguintes ações:

- 1) Investigar o perfil de metilação de genes da via de sinalização do cálcio em um maior número de amostras de adenocarcinoma ductal pancreático para confirmar os achados em diferentes estágios do desenvolvimento do tumor;
- 2) Analisar o perfil global de metilação do carcinoma de ampola de Vater e do adenocarcinoma duodenal;
- 3) Analisar a expressão proteica das HDACs em amostras teciduais de adenocarcinoma duodenal e colangiocarcinoma distal por imunohistoquímica;
- 4) Ampliar a investigação do impacto da combinação das variantes patogênicas de *NF1* e *CFTR* sobre a predisposição aumentada para desenvolvimento de carcinomas periampulares em modelos experimentais e a partir da análise dos tumores identificados em um caso clínico.

CAPÍTULO X: REFERÊNCIAS

- ADSAY, V. et al. Ampullary region carcinomas: definition and site specific classification with delineation of four clinicopathologically and prognostically distinct subsets in an analysis of 249 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 36, n. 11, p. 1592-608, Nov 2012. ISSN 1532-0979.
- ALBORES-SAAVEDRA, J. et al. Cancers of the ampulla of vater: demographics, morphology, and survival based on 5,625 cases from the SEER program. **J Surg Oncol**, v. 100, n. 7, p. 598-605, Dec 1 2009. ISSN 1096-9098
- ALEMAR, B.; GREGÓRIO, C.; ASHTON-PROLLA, P. miRNAs As Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: A Review. **Biomark Insights**, v. 10, p. 113-24, 2015. ISSN 1177-2719.
- AMRUTKAR, M.; GLADHAUG, I. P. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. **Cancers (Basel)**, v. 9, n. 11, Nov 2017. ISSN 2072-6694.
- ASMAR, F.; SØGAARD, A.; GRØNBÆK, K. DNA Methylation and Hydroxymethylation in Cancer. In: (Ed.). **Epigentic and Cancer Therapy**, 2015.
- BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A. Pancreatic cancer biology and genetics. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 12, p. 897-909, Dec 2002. ISSN 1474-175X.
- BATABYAL, P. et al. Association of diabetes mellitus and pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of 88 studies. **Ann Surg Oncol**, v. 21, n. 7, p. 2453-62, Jul 2014. ISSN 1534-4681.
- BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genet**, v. 16, n. 4, p. 168-74, Apr 2000. ISSN 0168-9525.
- BELTRAN, M. A.; CRUCES, K. S. Primary tumors of jejunum and ileum as a cause of intestinal obstruction: a case control study. **Int J Surg**, v. 5, n. 3, p. 183-91, Jun 2007. ISSN 1743-9159.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 11-21, Oct 2000. ISSN 1471-0072.
- BERTIN, C. et al. Pancreas divisum is not a cause of pancreatitis by itself but acts as a partner of genetic mutations. **Am J Gastroenterol**, v. 107, n. 2, p. 311-7, Feb 2012. ISSN 1572-0241.
- BHANDARI, R. et al. Somatostatinoma of the minor papilla treated by local excision in a patient with neurofibromatosis type 1. **JOP**, v. 16, n. 1, p. 81-4, Jan 2015. ISSN 1590-8577.
- BI, G.; JIANG, G. The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects. **Cell Mol Immunol**, v. 3, n. 4, p. 285-90, Aug 2006. ISSN 1672-7681.
- BIBIKOVA, M. et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. **Genomics**, v. 98, n. 4, p. 288-95, Oct 2011. ISSN 1089-8646.
- BOSMAN, F. et al. **WHO Classification of Tumours of the Digestive System**. Seventh edition. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2010.
- BOYE, K.; MAELANDSMO, G. M. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. **Am J Pathol**, v. 176, n. 2, p. 528-35, Feb 2010. ISSN 1525-2191.

- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 11 2018. ISSN 1542-4863.
- BROWN, C. E. et al. The many HATs of transcription coactivators. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 1, p. 15-9, Jan 2000. ISSN 0968-0004.
- BRUNE, K. et al. Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 12, p. 3536-42, Dec 2008. ISSN 1055-9965.
- BRÜCHER, B. L. et al. Hypermethylation of hMLH1, HPP1, p14(ARF), p16(INK4A) and APC in primary adenocarcinomas of the small bowel. **Int J Cancer**, v. 119, n. 6, p. 1298-302, Sep 2006. ISSN 0020-7136.
- CAI, M. H. et al. Depletion of HDAC1, 7 and 8 by Histone Deacetylase Inhibition Confers Elimination of Pancreatic Cancer Stem Cells in Combination with Gemcitabine. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 1621, Jan 2018. ISSN 2045-2322.
- CARTER, J. T. et al. Tumors of the ampulla of vater: histopathologic classification and predictors of survival. **J Am Coll Surg**, v. 207, n. 2, p. 210-8, Aug 2008. ISSN 1879-1190.
- CHANG, D. K. et al. Histomolecular phenotypes and outcome in adenocarcinoma of the ampulla of vater. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 10, p. 1348-56, Apr 2013. ISSN 1527-7755.
- CHEN, Y. F. et al. Remodeling of calcium signaling in tumor progression. **J Biomed Sci**, v. 20, p. 23, Apr 2013. ISSN 1423-0127.
- CHUNG, S. D. et al. More than 9-times increased risk for pancreatic cancer among patients with acute pancreatitis in Chinese population. **Pancreas**, v. 41, n. 1, p. 142-6, Jan 2012. ISSN 1536-4828.
- CICENAS, J. et al. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 9, n. 5, Apr 2017. ISSN 2072-6694.
- CIMINO, P. J.; GUTMANN, D. H. Neurofibromatosis type 1. **Handb Clin Neurol**, v. 148, p. 799-811, 2018. ISSN 0072-9752.
- COHEN, N. M.; KENIGSBURG E FAU - TANAY, A.; TANAY, A. Primate CpG islands are maintained by heterogeneous evolutionary regimes involving minimal selection. n. 1097-4172 (Electronic)
- COLLISSON, E. A.; MAITRA, A. Pancreatic Cancer Genomics 2.0: Profiling Metastases. **Cancer Cell**, v. 31, n. 3, p. 309-310, 03 2017. ISSN 1878-3686.
- CURTIUS, K.; WRIGHT, N. A.; GRAHAM, T. A. An evolutionary perspective on field cancerization. **Nat Rev Cancer**, v. 18, n. 1, p. 19-32, Jan 2018. ISSN 1474-1768.
- DANIEL, S. K. et al. Hypoxia as a barrier to immunotherapy in pancreatic adenocarcinoma. **Clin Transl Med**, v. 8, n. 1, p. 10, Apr 2019. ISSN 2001-1326.
- DELPU, Y. et al. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. **Curr Genomics**, v. 12, n. 1, p. 15-24, Mar 2011. ISSN 1875-5488.
- DEOLIVEIRA, M. L. et al. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. **Ann Surg**, v. 245, n. 5, p. 755-62, May 2007. ISSN 0003-4932.

- DOUGAN, S. K. The Pancreatic Cancer Microenvironment. **Cancer J**, v. 23, n. 6, p. 321-325, 2017 Nov/Dec 2017. ISSN 1540-336X.
- EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-63, May 2004. ISSN 1476-4687.
- EHRlich, M. DNA hypomethylation in cancer cells. **Epigenomics**, v. 1, n. 2, p. 239-59, Dec 2009. ISSN 1750-192X.
- EKWALL, K. Genome-wide analysis of HDAC function. **Trends Genet**, v. 21, n. 11, p. 608-15, Nov 2005. ISSN 0168-9525.
- ELSHERIF, S. B. et al. Pancreatitis and PDAC: association and differentiation. **Abdom Radiol (NY)**, Nov 2019. ISSN 2366-0058.
- ENE-OBONG, A. et al. Activated pancreatic stellate cells sequester CD8+ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Gastroenterology**, v. 145, n. 5, p. 1121-32, Nov 2013. ISSN 1528-0012.
- FANCIULLI, M.; PETRETTO, E.; AITMAN, T. J. Gene copy number variation and common human disease. **Clin Genet**, v. 77, n. 3, p. 201-13, Mar 2010. ISSN 1399-0004.
- FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics takes center stage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 2, p. 392-4, Jan 2001. ISSN 0027-8424.
- FERNÁNDEZ PÉREZ, E. R. et al. Epidemiology of Hypersensitivity Pneumonitis among an Insured Population in the United States: A Claims-based Cohort Analysis. **Ann Am Thorac Soc**, v. 15, n. 4, p. 460-469, 04 2018. ISSN 2325-6621.
- FISHER, W.; BAKEY, M. Differences between Ampullary, Periampullary and Pancreatic Cancer. **World Journal of Surgery**. 31: 144-146 p. 2007.
- FRITSCHÉ, P. et al. HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. **Gut**, v. 58, n. 10, p. 1399-409, Oct 2009. ISSN 1468-3288.
- FU, T. et al. Methylation of MGMT Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Stage III Duodenal Adenocarcinoma. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162929, 2016. ISSN 1932-6203.
- FUKUSHIMA, N. et al. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. **Am J Pathol**, v. 160, n. 5, p. 1573-81, May 2002. ISSN 0002-9440.
- FUNDATION, C. What is cholangiocarcinoma (bile duct cancer)? , 2020. Accessed on: 02 jan.
- GASPAR, B. et al. Current strategies in the therapeutic approach for adenocarcinoma of the ampulla of Vater. **J Med Life**, v. 6, n. 3, p. 260-5, Sep 2013. ISSN 1844-3117.
- GENKINGER, J. M. et al. A pooled analysis of 14 cohort studies of anthropometric factors and pancreatic cancer risk. **Int J Cancer**, v. 129, n. 7, p. 1708-17, Oct 2011. ISSN 1097-0215.
- GINGRAS, M. C. et al. Ampullary Cancers Harbor ELF3 Tumor Suppressor Gene Mutations and Exhibit Frequent WNT Dysregulation. **Cell Rep**, v. 14, n. 4, p. 907-919, Feb 2016. ISSN 2211-1247.

- GRASSO, C.; JANSEN, G.; GIOVANNETTI, E. Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 114, p. 139-152, Jun 2017. ISSN 1879-0461.
- GREER, J. B.; WHITCOMB, D. C.; BRAND, R. E. Genetic predisposition to pancreatic cancer: a brief review. **Am J Gastroenterol**, v. 102, n. 11, p. 2564-9, Nov 2007. ISSN 0002-9270.
- GREGORETTI, I. V.; LEE, Y. M.; GOODSON, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. **J Mol Biol**, v. 338, n. 1, p. 17-31, Apr 2004. ISSN 0022-2836.
- GROTH, A. et al. Chromatin challenges during DNA replication and repair. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 721-33, Feb 2007. ISSN 0092-8674.
- GROZINGER, C. M.; SCHREIBER, S. L. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. **Chem Biol**, v. 9, n. 1, p. 3-16, Jan 2002. ISSN 1074-5521.
- GUARNERI, G. et al. Diagnostic strategy with a solid pancreatic mass. **Presse Med**, v. 48, n. 3 Pt 2, p. e125-e145, Mar 2019. ISSN 2213-0276.
- GUILMETTE, J. M.; NOSÉ, V. Neoplasms of the Neuroendocrine Pancreas: An Update in the Classification, Definition, and Molecular Genetic Advances. **Adv Anat Pathol**, v. 26, n. 1, p. 13-30, Jan 2019. ISSN 1533-4031.
- GUO, R. et al. Aberrant expression of p53, p21, cyclin D1, and Bcl2 and their clinicopathological correlation in ampullary adenocarcinoma. **Hum Pathol**, v. 45, n. 5, p. 1015-23, May 2014. ISSN 1532-8392.
- GUTMANN, D. H. et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. **JAMA**, v. 278, n. 1, p. 51-7, Jul 1997. ISSN 0098-7484.
- HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L.; OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 1, p. 32-42, Jan 2009. ISSN 1471-0064.
- HADDAD, L. B. D. P. Expressão de marcadores imunoistoquímicos de origem tecidual e de carcinogênese nos adenocarcinomas tipo intestinal e pancreatobiliar da ampola de Vater. 2009. 150 (Doutorado). Departamento de Gastroenterologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- HAEBERLE, L.; ESPOSITO, I. Pathology of pancreatic cancer. **Transl Gastroenterol Hepatol**, v. 4, p. 50, 2019. ISSN 2415-1289.
- HAREWOOD, G. C.; WIERSEMA, M. J. Endosonography-guided fine needle aspiration biopsy in the evaluation of pancreatic masses. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 6, p. 1386-91, Jun 2002. ISSN 0002-9270.
- HE, J. et al. 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades. **HPB (Oxford)**, v. 16, n. 1, p. 83-90, Jan 2014. ISSN 1477-2574.
- HE, J. C. et al. TACC3 overexpression in cholangiocarcinoma correlates with poor prognosis and is a potential anti-cancer molecular drug target for HDAC inhibitors. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p. 75441-75456, Nov 2016. ISSN 1949-2553.

- HEGYI, P. et al. CFTR: A New Horizon in the Pathomechanism and Treatment of Pancreatitis. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 170, p. 37-66, 2016. ISSN 0303-4240 (Print) 0303-4240.
- HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med**, v. 349, n. 21, p. 2042-54, Nov 2003. ISSN 1533-4406.
- HIDALGO, M. Pancreatic cancer. **N Engl J Med**, v. 362, n. 17, p. 1605-17, Apr 2010. ISSN 1533-4406.
- HONG, S. M. et al. Genome-wide somatic copy number alterations in low-grade PanINs and IPMNs from individuals with a family history of pancreatic cancer. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 16, p. 4303-12, Aug 2012. ISSN 1078-0432.
- HOWE, J. R. et al. Factors predictive of survival in ampullary carcinoma. **Ann Surg**, v. 228, n. 1, p. 87-94, Jul 1998. ISSN 0003-4932.
- HRUBAN, R. H.; WILENTZ, R. E.; KERN, S. E. Genetic progression in the pancreatic ducts. **Am J Pathol**, v. 156, n. 6, p. 1821-5, Jun 2000. ISSN 0002-9440.
- IAFRATE, A. J. et al. Detection of large-scale variation in the human genome. **Nat Genet**, v. 36, n. 9, p. 949-51, Sep 2004. ISSN 1061-4036.
- IARC. (International Agency for Research on Cancer) PRESS RELEASE N° 263: "Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018". Geneva, Switzerland, 2018. Available at: < https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf >. Accessed on: 04/jan/2020.
- INCA. (Instituto Nacional do Câncer) Atlas On-line de Mortalidade. p. Taxas de mortalidade por câncer, brutas e ajustadas por idade pelas populações mundial e brasileira, por 100.000, segundo sexo, faixa etária, localidade e por período selecionado., 2014. Available at: < <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml#panelResultado> >. Accessed on: 04/01/2020.
- INCA. (Instituto Nacional do Câncer) Pâncreas. 2018. Available at: < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas> >. Accessed on: 20 dez 2019.
- IODICE, S. et al. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. **Langenbecks Arch Surg**, v. 393, n. 4, p. 535-45, Jul 2008. ISSN 1435-2451.
- ISHIBASHI, Y. et al. Morphometric study of the sphincter of oddi (hepatopancreatic) and configuration of the submucosal portion of the sphincteric muscle mass. **Clin Anat**, v. 13, n. 3, p. 159-67, 2000. ISSN 0897-3806.
- JIANG, Y. et al. Genome-wide distribution of DNA methylation and DNA demethylation and related chromatin regulators in cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1835, n. 2, p. 155-63, Apr 2013. ISSN 0006-3002.
- JIAO, F. et al. Histone deacetylase 3 promotes pancreatic cancer cell proliferation, invasion and increases drug-resistance through histone modification of P27, P53 and Bax. **Int J Oncol**, v. 45, n. 4, p. 1523-30, Oct 2014. ISSN 1791-2423.

- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 6, p. 415-28, Jun 2002. ISSN 1471-0056.
- JUNG, D. E. et al. CG200745, an HDAC inhibitor, induces anti-tumour effects in cholangiocarcinoma cell lines via miRNAs targeting the Hippo pathway. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 10921, 09 2017. ISSN 2045-2322.
- KAMARAJAH, S. K. Pancreaticoduodenectomy for periampullary tumours: a review article based on Surveillance, End Results and Epidemiology (SEER) database. **Clin Transl Oncol**, v. 20, n. 9, p. 1153-1160, Sep 2018. ISSN 1699-3055.
- KIM, J. H. et al. Differential diagnosis of periampullary carcinomas at MR imaging. **Radiographics**, v. 22, n. 6, p. 1335-52, 2002 Nov-Dec 2002. ISSN 0271-5333.
- KIM, S. G. et al. Epigenetic and genetic alterations in duodenal carcinomas are distinct from biliary and ampullary carcinomas. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1300-10, May 2003. ISSN 0016-5085.
- KIMURA, W. et al. Different clinicopathologic findings in two histologic types of carcinoma of papilla of Vater. **Jpn J Cancer Res**, v. 85, n. 2, p. 161-6, Feb 1994. ISSN 0910-5050.
- KIMURA, W.; FUTAKAWA, N.; ZHAO, B. Neoplastic diseases of the papilla of Vater. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**, v. 11, n. 4, p. 223-31, 2004. ISSN 0944-1166.
- KIRKEGARD, J.; MORTENSEN, F. V.; CRONIN-FENTON, D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. **Am J Gastroenterol**, v. 112, n. 9, p. 1366-1372, Sep 2017. ISSN 0002-9270.
- KIRKEGÅRD, J. et al. Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Nationwide Matched-Cohort Study in Denmark. **Gastroenterology**, v. 154, n. 6, p. 1729-1736, 05 2018. ISSN 1528-0012.
- KIRKEGÅRD, J.; MORTENSEN, F. V.; CRONIN-FENTON, D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. **Am J Gastroenterol**, v. 112, n. 9, p. 1366-1372, Sep 2017. ISSN 1572-0241.
- KLAUSS, M. et al. Value of three-dimensional reconstructions in pancreatic carcinoma using multidetector CT: initial results. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 46, p. 5827-32, Dec 2009. ISSN 2219-2840.
- KLEEFF, J. et al. Pancreatic cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16022, 04 2016. ISSN 2056-676X.
- KLEIN, A. P. et al. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. **Cancer Res**, v. 64, n. 7, p. 2634-8, Apr 2004. ISSN 0008-5472.
- KLIESER, E. et al. Role of histone deacetylases in pancreas: Implications for pathogenesis and therapy. **World J Gastrointest Oncol**, v. 7, n. 12, p. 473-83, Dec 2015. ISSN 1948-5204.
- KOHLER, I. et al. Phenotypic and genotypic characterization of carcinomas of the papilla of Vater has prognostic and putative therapeutic implications. **Am J Clin Pathol**, v. 135, n. 2, p. 202-11, Feb 2011. ISSN 1943-7722.

- KUMARI, N. et al. Intestinal and pancreatobiliary differentiation in periampullary carcinoma: the role of immunohistochemistry. **Hum Pathol**, v. 44, n. 10, p. 2213-9, Oct 2013. ISSN 1532-8392.
- KUNATH, U.; HOMMERDING, H. [Is the duodenal papilla an autonomic sphincter? A contribution to the functional morphology (author's transl)]. **Res Exp Med (Berl)**, v. 178, n. 2, p. 103-16, 1981. ISSN 0300-9130.
- KUZMICKIENE, I. et al. Smoking and other risk factors for pancreatic cancer: a cohort study in men in Lithuania. **Cancer Epidemiol**, v. 37, n. 2, p. 133-9, Apr 2013. ISSN 1877-783X.
- LAKSHMAIAH, K. C. et al. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. **J Cancer Res Ther**, v. 10, n. 3, p. 469-78, 2014 Jul-Sep 2014. ISSN 1998-4138.
- LEE, D. Y. et al. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. **Cell**, v. 72, n. 1, p. 73-84, Jan 1993. ISSN 0092-8674.
- LEE, J. H. et al. Significance analysis of histologic type and perineural invasion as prognostic factors after curative resection of ampulla of Vater carcinoma. **Hepatogastroenterology**, v. 57, n. 99-100, p. 646-52, 2010 May-Jun 2010. ISSN 0172-6390.
- LEE, P. J.; PAPACHRISTOU, G. I. New insights into acute pancreatitis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 16, n. 8, p. 479-496, 08 2019. ISSN 1759-5053.
- LEHMANN, A. et al. High class I HDAC activity and expression are associated with RelA/p65 activation in pancreatic cancer in vitro and in vivo. **BMC Cancer**, v. 9, p. 395, 2009. ISSN 1471-2407.
- LEVY, S. et al. The diploid genome sequence of an individual human. **PLoS Biol**, v. 5, n. 10, p. e254, Sep 2007. ISSN 1545-7885.
- LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 707-19, Feb 2007. ISSN 0092-8674.
- LI, D. et al. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. **JAMA**, v. 301, n. 24, p. 2553-62, Jun 2009. ISSN 1538-3598.
- LI, D. et al. Diabetes and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis of three large case-control studies. **Cancer Causes Control**, v. 22, n. 2, p. 189-97, Feb 2011. ISSN 1573-7225.
- LIAO, K. F. et al. Diabetes mellitus correlates with increased risk of pancreatic cancer: a population-based cohort study in Taiwan. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 27, n. 4, p. 709-13, Apr 2012. ISSN 1440-1746.
- LIGGETT, W. H.; SIDRANSKY, D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 3, p. 1197-206, Mar 1998. ISSN 0732-183X.
- LIU, F. SMAD4/DPC4 and pancreatic cancer survival. Commentary re: M. Tascilar et al., The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7: 4115-4121, 2001. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 12, p. 3853-6, Dec 2001. ISSN 1078-0432.
- LOCKE, W. J. et al. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. **Front Genet**, v. 10, p. 1150, 2019. ISSN 1664-8021.

- LOMBERK, G. A.; URRUTIA, R. The Triple-Code Model for Pancreatic Cancer: Cross Talk Among Genetics, Epigenetics, and Nuclear Structure. **Surg Clin North Am**, v. 95, n. 5, p. 935-52, Oct 2015. ISSN 1558-3171.
- LOPEZ, J. et al. The context and potential of epigenetics in oncology. **Br J Cancer**, v. 100, n. 4, p. 571-7, Feb 2009. ISSN 1532-1827.
- LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251-60, Sep 1997. ISSN 0028-0836.
- LUND, A. H.; VAN LOHUIZEN, M. Epigenetics and cancer. **Genes Dev**, v. 18, n. 19, p. 2315-35, Oct 2004. ISSN 0890-9369.
- LYNCH, S. M. et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. **Am J Epidemiol**, v. 170, n. 4, p. 403-13, Aug 2009. ISSN 1476-6256.
- LÜTTGES, J.; ZAMBONI, G.; KLÖPPEL, G. Recommendation for the examination of pancreaticoduodenectomy specimens removed from patients with carcinoma of the exocrine pancreas. A proposal for a standardized pathological staging of pancreaticoduodenectomy specimens including a checklist. **Dig Surg**, v. 16, n. 4, p. 291-6, 1999. ISSN 0253-4886.
- MAFFICINI, A. et al. Ampulla of Vater Carcinoma: Sequencing Analysis Identifies TP53 Status as a Novel Independent Prognostic Factor and Potentially Actionable ERBB, PI3K, and WNT Pathways Gene Mutations. **Ann Surg**, v. 267, n. 1, p. 149-156, Jan 2018. ISSN 1528-1140. MAISONNEUVE, P.; LOWENFELS, A. B. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. **Int J Epidemiol**, v. 44, n. 1, p. 186-98, Feb 2015. ISSN 1464-3685.
- MAITRA, A.; HRUBAN, R. H. Pancreatic cancer. **Annu Rev Pathol**, v. 3, p. 157-88, 2008. ISSN 1553-4006.
- MAZZIO, E. A.; SOLIMAN, K. F. Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. **Epigenetics**, v. 7, n. 2, p. 119-30, Feb 2012. ISSN 1559-2308.
- MCAULIFFE, J. C.; CHRISTEIN, J. D. Type 2 diabetes mellitus and pancreatic cancer. **Surg Clin North Am**, v. 93, n. 3, p. 619-27, Jun 2013. ISSN 1558-3171.
- MCGUIGAN, A. et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. **World J Gastroenterol**, v. 24, n. 43, p. 4846-4861, Nov 2018. ISSN 2219-2840.
- MICHAUD, D. S. et al. Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan). **Cancer Causes Control**, v. 21, n. 8, p. 1213-25, Aug 2010. ISSN 1573-7225.
- MIDHA, S.; CHAWLA, S.; GARG, P. K. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. **Cancer Lett**, v. 381, n. 1, p. 269-77, 10 2016. ISSN 1872-7980.
- MISHRA, N. K.; GUDA, C. Genome-wide DNA methylation analysis reveals molecular subtypes of pancreatic cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 28990-29012, Apr 2017. ISSN 1949-2553.

- MIYAKE, K. et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. **Pancreas**, v. 36, n. 3, p. e1-9, Apr 2008. ISSN 0885-3177.
- MIZUNO, S. et al. Smoking, family history of cancer, and diabetes mellitus are associated with the age of onset of pancreatic cancer in Japanese patients. **Pancreas**, v. 43, n. 7, p. 1014-7, Oct 2014. ISSN 1536-4828.
- MONSON, J. R. et al. Radical resection for carcinoma of the ampulla of Vater. **Arch Surg**, v. 126, n. 3, p. 353-7, Mar 1991. ISSN 0004-0010.
- MONTEITH, G. R.; DAVIS, F. M.; ROBERTS-THOMSON, S. J. Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. **J Biol Chem**, v. 287, n. 38, p. 31666-73, Sep 2012. ISSN 1083-351X.
- MONTEITH, G. R. et al. Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 7, p. 519-30, Jul 2007. ISSN 1474-175X.
- MORINE, Y. et al. Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Surgery**, v. 151, n. 3, p. 412-9, Mar 2012. ISSN 1532-7361.
- MORRISON, A. H.; BYRNE, K. T.; VONDERHEIDE, R. H. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. **Trends Cancer**, v. 4, n. 6, p. 418-428, 06 2018. ISSN 2405-8025.
- MUNIGALA, S. et al. Increased risk of pancreatic adenocarcinoma after acute pancreatitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 7, p. 1143-1150.e1, Jul 2014. ISSN 1542-7714.
- NEUZILLET, C.; SAUVANET, A.; HAMMEL, P. Prognostic factors for resectable pancreatic adenocarcinoma. **J Visc Surg**, v. 148, n. 4, p. e232-43, Sep 2011. ISSN 1878-7886.
- NONES, K. et al. Genome-wide DNA methylation patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma reveal epigenetic deregulation of SLIT-ROBO, ITGA2 and MET signaling. **Int J Cancer**, v. 135, n. 5, p. 1110-8, Sep 2014. ISSN 1097-0215.
- OHIKE, N. et al. Intra-ampullary papillary-tubular neoplasm (IAPN): characterization of tumoral intraepithelial neoplasia occurring within the ampulla: a clinicopathologic analysis of 82 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 12, p. 1731-48, Dec 2010. ISSN 1532-0979.
- OMURA, N.; GOGGINS, M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 2, n. 4, p. 310-26, 2009. ISSN 1936-2625.
- ORTH, M. et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. **Radiat Oncol**, v. 14, n. 1, p. 141, Aug 2019. ISSN 1748-717X.
- OUAÏSSI, M. et al. High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. **Ann Surg Oncol**, v. 15, n. 8, p. 2318-28, Aug 2008. ISSN 1534-4681.
- OUAÏSSI, M. et al. Further characterization of HDAC and SIRT gene expression patterns in pancreatic cancer and their relation to disease outcome. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108520, 2014. ISSN 1932-6203.

- OVERMAN, M. J. et al. A population-based comparison of adenocarcinoma of the large and small intestine: insights into a rare disease. **Ann Surg Oncol**, v. 19, n. 5, p. 1439-45, May 2012. ISSN 1534-4681.
- OVERMAN, M. J. et al.. Prognostic value of lymph node evaluation in small bowel adenocarcinoma: analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database. **Cancer**, v. 116, n. 23, p. 5374-82, Dec 2010. ISSN 0008-543X.
- OVERMAN, M. J. et al.. Gene expression profiling of ampullary carcinomas classifies ampullary carcinomas into biliary-like and intestinal-like subtypes that are prognostic of outcome. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65144, 2013. ISSN 1932-6203.
- PARAB, T. M. et al. Gastrointestinal stromal tumors: a comprehensive review. **J Gastrointest Oncol**, v. 10, n. 1, p. 144-154, Feb 2019. ISSN 2078-6891.
- PELUCCHI, C. et al. Smoking and body mass index and survival in pancreatic cancer patients. n. 1536-4828 (Electronic),
- PENG, D. F. et al. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 6, p. 1160-8, Jun 2006. ISSN 0143-3334.
- PETERSON, C. L.; LANIEL, M. A. Histones and histone modifications. **Curr Biol**, v. 14, n. 14, p. R546-51, Jul 2004. ISSN 0960-9822.
- PEZZILLI, R.; PAGANO, N. Is diabetes mellitus a risk factor for pancreatic cancer? **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 30, p. 4861-6, Aug 2013. ISSN 2219-2840.
- PFEIFER, G. P. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 4, Apr 2018. ISSN 1422-0067.
- PORUK, K. E. et al. Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? **Ann Surg**, v. 257, n. 1, p. 17-26, Jan 2013. ISSN 1528-1140.
- RAHIB, L. et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. **Cancer Res**, v. 74, n. 11, p. 2913-21, Jun 2014. ISSN 1538-7445.
- RAIMONDI, S. et al. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 24, n. 3, p. 349-58, Jun 2010. ISSN 1532-1916.
- RAIMONDI, S.; MAISONNEUVE, P.; LOWENFELS, A. B. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 12, p. 699-708, Dec 2009. ISSN 1759-5053.
- RANDI, G. et al. Epidemiology of biliary tract cancers: an update. **Ann Oncol**, v. 20, n. 1, p. 146-59, Jan 2009. ISSN 1569-8041.
- RAWLA, P.; SUNKARA, T.; GADUPUTI, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. **World J Oncol**, v. 10, n. 1, p. 10-27, Feb 2019. ISSN 1920-454X.

- RAYNAL, N. J. et al. Targeting Calcium Signaling Induces Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes in Cancer. **Cancer Res**, v. 76, n. 6, p. 1494-505, Mar 2016. ISSN 1538-7445.
- RAZIN, A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. **EMBO J**, v. 17, n. 17, p. 4905-8, Sep 1998. ISSN 0261-4189.
- RAZUMILAVA, N.; GORES, G. J. Cholangiocarcinoma. **Lancet**, v. 383, n. 9935, p. 2168-79, Jun 2014. ISSN 1474-547X.
- REDSTON, M. S. et al. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. **Cancer Res**, v. 54, n. 11, p. 3025-33, Jun 1994. ISSN 0008-5472.
- RELLES, D. et al. Periampullary and duodenal neoplasms in neurofibromatosis type 1: two cases and an updated 20-year review of the literature yielding 76 cases. **J Gastrointest Surg**, v. 14, n. 6, p. 1052-61, Jun 2010. ISSN 1873-4626.
- RHIM, A. D. et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. **Cell**, v. 148, n. 1-2, p. 349-61, Jan 2012. ISSN 1097-4172.
- RIJKERS, A. P. et al. Risk of Pancreatic Cancer After a Primary Episode of Acute Pancreatitis. **Pancreas**, v. 46, n. 8, p. 1018-1022, 09 2017. ISSN 1536-4828.
- ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Mol Oncol**, v. 1, n. 1, p. 19-25, Jun 2007. ISSN 1878-0261.
- ROSATO, V. et al. Population attributable risk for pancreatic cancer in Northern Italy. **Pancreas**, v. 44, n. 2, p. 216-20, Mar 2015. ISSN 1536-4828.
- ROSTY, C. et al. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. **Am J Pathol**, v. 160, n. 1, p. 45-50, Jan 2002. ISSN 0002-9440.
- SAMOKHVALOV, A. V.; REHM, J.; ROERECKE, M. Alcohol Consumption as a Risk Factor for Acute and Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and a Series of Meta-analyses. **EBioMedicine**, v. 2, n. 12, p. 1996-2002, Dec 2015. ISSN 2352-3964.
- SANAEI, M.; KAVOOSI, F. Histone Deacetylases and Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action in Various Cancers. **Adv Biomed Res**, v. 8, p. 63, 2019. ISSN 2277-9175.
- SANDHU, V. et al. Molecular signatures of mRNAs and miRNAs as prognostic biomarkers in pancreatobiliary and intestinal types of periampullary adenocarcinomas. **Mol Oncol**, v. 9, n. 4, p. 758-71, Apr 2015. ISSN 1878-0261.
- SAWAN, C. et al. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutat Res**, v. 642, n. 1-2, p. 1-13, Jul 2008. ISSN 0027-5107.
- SCARÀ, S.; BOTTONI, P.; SCATENA, R. CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. **Adv Exp Med Biol**, v. 867, p. 247-60, 2015. ISSN 0065-2598.
- SCHNEIDER, A. et al. Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 162-71, Jan 2011. ISSN 1528-0012.

- SCHNEIDER, G. et al. Targeting histone deacetylases in pancreatic ductal adenocarcinoma. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 6A, p. 1255-63, Jun 2010. ISSN 1582-4934.
- SCHNEIDER, G. et al. Acetylation as a transcriptional control mechanism-HDACs and HATs in pancreatic ductal adenocarcinoma. **J Gastrointest Cancer**, v. 42, n. 2, p. 85-92, Jun 2011. ISSN 1941-6636.
- SCHÖNLEBEN, F. et al. Molecular analysis of PIK3CA, BRAF, and RAS oncogenes in periampullary and ampullary adenomas and carcinomas. **J Gastrointest Surg**, v. 13, n. 8, p. 1510-6, Aug 2009. ISSN 1873-4626.
- SEBAT, J. et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. **Science**, v. 305, n. 5683, p. 525-8, Jul 2004. ISSN 1095-9203.
- SHI, C.; HRUBAN, R. H.; KLEIN, A. P. Familial pancreatic cancer. **Arch Pathol Lab Med**, v. 133, n. 3, p. 365-74, Mar 2009. ISSN 1543-2165.
- SHIRAKAWA, K. et al. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. **Trends Microbiol**, v. 21, n. 6, p. 277-85, Jun 2013. ISSN 1878-4380.
- SIMIANU, V. V. et al. Pancreatic cancer: progress made. **Acta Oncol**, v. 49, n. 4, p. 407-17, May 2010. ISSN 1651-226X.
- SINGH, A. et al. Panobinostat as Pan-deacetylase Inhibitor for the Treatment of Pancreatic Cancer: Recent Progress and Future Prospects. **Oncol Ther**, v. 4, n. 1, p. 73-89, 2016. ISSN 2366-1070 (Print) 2366-1089.
- SRIRAKSA, R.; LIMPAIBOON, T. Histone deacetylases and their inhibitors as potential therapeutic drugs for cholangiocarcinoma - cell line findings. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 4, p. 2503-8, 2013. ISSN 2476-762X.
- STOJSIC, Z. et al. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the ampulla of Vater. **Med Oncol**, v. 27, n. 4, p. 1144-8, Dec 2010. ISSN 1559-131X.
- TANG, B. et al. Clinicopathological Significance of CDKN2A Promoter Hypermethylation Frequency with Pancreatic Cancer. **Sci Rep**, v. 5, p. 13563, Sep 2015. ISSN 2045-2322.
- TEMPERO, M. A. et al. Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 15, n. 8, p. 1028-1061, 08 2017. ISSN 1540-1413.
- TERADA, T. Malignant tumors of the small intestine: a histopathologic study of 41 cases among 1,312 consecutive specimens of small intestine. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 5, n. 3, p. 203-9, 2012. ISSN 1936-2625.
- TOZAWA, T. et al. Promoter hypermethylation of DAP-kinase is associated with poor survival in primary biliary tract carcinoma patients. **Cancer Sci**, v. 95, n. 9, p. 736-40, Sep 2004. ISSN 1347-9032.
- TSAI, H. J.; CHANG, J. S. Environmental Risk Factors of Pancreatic Cancer. **J Clin Med**, v. 8, n. 9, Sep 2019. ISSN 2077-0383.
- VALSANGKAR, N. P. et al. Survival in ampullary cancer: potential role of different KRAS mutations. **Surgery**, v. 157, n. 2, p. 260-8, Feb 2015. ISSN 1532-7361.

- VINCENT, A. et al. Pancreatic cancer. **Lancet**, v. 378, n. 9791, p. 607-20, Aug 2011. ISSN 1474-547X.
- VINCENT, A. et al. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 13, p. 4341-54, Jul 2011. ISSN 1078-0432. >.
- WAISBERG, J. et al. Carcinoid of the minor duodenal papilla associated with pancreas divisum: Case report and review of the literature. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 61, n. 4, p. 365-8, Aug 2006. ISSN 1807-5932.
- WANG, G. et al. Class I and class II histone deacetylases are potential therapeutic targets for treating pancreatic cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52095, 2012. ISSN 1932-6203.
- WANG, W. et al. Significance of DNA methyltransferase-1 and histone deacetylase-1 in pancreatic cancer. **Oncol Rep**, v. 21, n. 6, p. 1439-47, Jun 2009. ISSN 1021-335X.
- WANG, X. X. et al. Large-scale DNA methylation expression analysis across 12 solid cancers reveals hypermethylation in the calcium-signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 7, p. 11868-11876, Feb 2017. ISSN 1949-2553.
- WANG, Y. et al. Role of the microbiome in occurrence, development and treatment of pancreatic cancer. **Mol Cancer**, v. 18, n. 1, p. 173, Dec 2019. ISSN 1476-4598.
- WANG, Y. T. et al. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. **BMC Cancer**, v. 16, p. 212, Mar 2016. ISSN 1471-2407.
- WEST, A. C.; JOHNSTONE, R. W. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. **J Clin Invest**, v. 124, n. 1, p. 30-9, Jan 2014. ISSN 1558-8238.
- WESTGAARD, A. et al. Pancreatobiliary versus intestinal histologic type of differentiation is an independent prognostic factor in resected periampullary adenocarcinoma. **BMC Cancer**, v. 8, p. 170, 2008. ISSN 1471-2407.
- WHO; SALTO-TELLEZ, M.; RUGGE, M. (World Health Organization) Tumors of the small intestine and ampulla. In: (Ed.). **Classification of tumours of the digestive system**. 5th. Lyon, 2019.
- WILLIS, J. A. et al. Genome-wide analysis of the role of copy-number variation in pancreatic cancer risk. **Front Genet**, v. 5, p. 29, 2014. ISSN 1664-8021.
- WONG, J. C.; LU, D. S. Staging of pancreatic adenocarcinoma by imaging studies. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 12, p. 1301-8, Dec 2008. ISSN 1542-7714.
- XUE, Y. et al. Immunohistochemical Classification of Ampullary Carcinomas: Critical Reappraisal Fails to Confirm Prognostic Relevance for Recently Proposed Panels, and Highlights MUC5AC as a Strong Prognosticator. **Am J Surg Pathol**, v. 41, n. 7, p. 865-876, Jul 2017. ISSN 1532-0979.
- YACHIDA, S. et al. Genomic Sequencing Identifies ELF3 as a Driver of Ampullary Carcinoma. **Cancer Cell**, v. 29, n. 2, p. 229-40, Feb 2016. ISSN 1878-3686.

- YAMAGUCHI, H. et al. The discrete nature and distinguishing molecular features of pancreatic intraductal tubulopapillary neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms of the gastric type, pyloric gland variant. **J Pathol**, v. 231, n. 3, p. 335-41, Nov 2013. ISSN 1096-9896.
- YAMAGUCHI, J. et al. Histone deacetylase inhibitor (SAHA) and repression of EZH2 synergistically inhibit proliferation of gallbladder carcinoma. **Cancer Sci**, v. 101, n. 2, p. 355-62, Feb 2010. ISSN 1349-7006.
- YANG, X. J.; SETO, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 206-18, Mar 2008. ISSN 1471-0080.
- YAO, Q.; CHEN, Y.; ZHOU, X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. **Curr Opin Chem Biol**, v. 51, p. 11-17, Aug 2019. ISSN 1879-0402. Available at: <
- ZHAN, W. et al. Germline Variants and Risk for Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Emerging Concepts. **Pancreas**, v. 47, n. 8, p. 924-936, 09 2018. ISSN 1536-4828.
- ZHOU, H. et al. Carcinoma of the ampulla of Vater: comparative histologic/immunohistochemical classification and follow-up. **Am J Surg Pathol**, v. 28, n. 7, p. 875-82, Jul 2004. ISSN 0147-5185 (Print) 0147-5185 (Linking).
- ZHU, Y. et al. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. **Immunity**, v. 47, n. 2, p. 323-338.e6, 08 2017. ISSN 1097-4180.
- ÖZDEMİR, B. C. et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. **Cancer Cell**, v. 25, n. 6, p. 719-34, Jun 2014. ISSN 1878-3686.

CAPÍTULO XI: ANEXOS

Manuscrtos em fase preparação desenvolvidos durante o período de Doutorado Sanduíche na International Agency for Research on Cancer:

Identification of tumor-specific differential methylation profile in periampullary carcinomas

Cleandra Gregório^{1,2*}, Sheila Coelho Soares Lima^{3*}, Bárbara Alemar¹, Fazlur Rahman Talukdar⁴, Ivaine Taís Sauthier Sartor¹, Raquel Camara Rivero^{5,6}, Simone Márcia dos Santos Machado⁶, Alessandro Bersch Osvaldt^{7,8}, Patricia Ashton-Prolla^{1,2}, Zdenko Herceg⁴, Luis Felipe Ribeiro Pinto³.

1. Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
2. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
3. Programa de Carcinogênese Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil
4. Epigenetic group- International Agency for Research on Cancer, Lyon, France;
5. Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
6. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
7. Grupo de Vias Biliares e Pâncreas, Cirurgia do Aparelho Digestivo, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
8. Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*** Equal contributors**

Correspondence to: Luis Felipe Ribeiro Pinto, lfrpinto@inca.gov.br.

Manuscrito a ser submetido em revista a definir.

ABSTRACT

Periampullary carcinomas (PACs) are rare neoplasms arising from pancreatic head, ampulla of Vater, distal biliary duct and proximal duodenum. PACs exhibit high mortality due to the lack of efficient therapy and the molecular mechanism underlying the development of these cancers is poorly understood as well as aberrant DNA methylation. We hypothesized that aberrant DNA methylation may be an important event in the tumorigenesis of PACs. To test this hypothesis, we aimed to conduct genome-wide methylation analysis of PACs comparing the methylome profiles of PAC tumors with the adjacent normal tissue (NT). Methylation profiles were investigated using Illumina's Infinium Human Methylation 450 BeadChip array in 17 PAC and 14 NT samples. Differential methylation among the samples was analyzed by robust regression. PAC exhibit distinct global methylation profiles in comparison to their NT. We identified a total of 5622 differentially methylated positions (DMPs) and 1056 differentially methylated regions (DMR) corresponding to 789 genes ($FDR \leq 0.05$, $\Delta\beta > 0.2$). Among PAC-specific DMRs, we found 14.2% (112 genes) were hypomethylated and 85.8% (671 genes) were hypermethylated. Some of the identified DMR-associated genes (*ZSCAN18*, *CDH13*, *RUNX3*, *DCLK1*, *CCND2*, *SLIT2* and *TWIST1*) were reported in previous studies on PAC, supporting the notion that specific genes may be consistently targeted by differential methylation. To further determine the potential biological relevance of the identified DMRs, pathway analyses were performed using Enrichr that revealed dysregulation in calcium signaling and signaling pathways regulating pluripotency. The present study identified specific differentially methylated genes underscoring the potential role of distinct pathways involved in the development and progression of PAC. These deregulated genes and pathways might be potentially exploited in the development of epigenetics-based strategies for biomarker discovery and therapeutic intervention.

Telomere length and telomerase components evaluation in periampullary carcinomas (ampulla of Vater carcinoma and duodenal adenocarcinoma)

Cleandra Gregório^{1,2}, Fazlur Rahman Talukdar³, Raquel Camara Rivero^{4,5}, Simone Márcia dos Santos Machado⁶, Valerie White³ Alessandro Bersch Osvaldt^{6,7}, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,6}, Zdenko Herceg³.

1. Departamento de Genética, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
2. Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
3. Epigenetic group- International Agency for Research on Cancer, Lyon, France;
4. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
5. Serviço de Patologia- Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
6. Grupo de Vias Biliares e Pâncreas – Cirurgia do Aparelho Digestivo, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
7. Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence to: Zdenko Herceg, hercegz@iarc.fr

Manuscrito a ser submetido em revista a definir.

ABSTRACT

Telomere maintenance is a critical requirement for enabling tumor replicative immortality. Here, telomerase expression, telomere length (TL) and potential regulatory factors that can underlie telomerase machinery alterations in periampullary carcinomas (PA, n= 20) were analyzed. The hTERT immunostaining was detected in 13/14 samples; additionally, we found short relative TL in tumors compared with normal duodenal adjacent tissues (ND, P = 0.01) assessed by qPCR. *hTERT* promoter hotspot mutations were not present, however, the c.-245bp TSS (rs2853669) was detected in 9/20 tumor samples. rs2853669 is located in an ETS (E-twenty six) family transcription factor consensus sequence which can increase *hTERT* expression. The telomere shortening is a common event in 70% of tumors and the rs2853669 may play a role by blocking the progressive telomere shortening by increasing telomerase expression in these tumors.

Colaboração em artigos durante o período de Doutorado relacionados aos seguintes temas:

Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver.



ORIGINAL ARTICLE

Basic Study

Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver

Ana Claudia Reis Schneider, Cleandra Gregório, Carolina Uribe-Cruz, Ranieli Guizzo, Tais Malysz, Maria Cristina Faccioni-Heuser, Larisse Longo, Themis Reverbel da Silveira

Ana Claudia Reis Schneider, Carolina Uribe-Cruz, Ranieli Guizzo, Larisse Longo, Themis Reverbel da Silveira, Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90035-903 RS, Brazil

Ana Claudia Reis Schneider, Carolina Uribe-Cruz, Larisse Longo, Themis Reverbel da Silveira, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Gastroenterologia e Hepatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90035-003 RS, Brazil

Cleandra Gregório, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), Porto Alegre, 90035-003 RS, Brazil

Tais Malysz, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (UFRGS), Porto Alegre, 90035-190 RS, Brazil

Maria Cristina Faccioni-Heuser, Departamento de Ciências Morfológicas (UFRGS), Porto Alegre, 90035-190 RS, Brazil

Maria Cristina Faccioni-Heuser, Centro de Microscopia Eletrônica (UFRGS), Porto Alegre, 91501-970 RS, Brazil

Author contributions: Schneider ACR and da Silveira TR conceived the project and designed the experiments; Gregório C, Guizzo R and Longo L carried out genetic assays and zebrafish liver histology; Malysz T and Faccioni-Heuser MC performed ultrastructural analysis; Schneider ACR and Uribe-Cruz C analysed the data; the manuscript was written by the first author Schneider ACR and reviewed by an English grammar professor; all authors contributed clarifications and guidance on the manuscript; all authors were involved in editing the manuscript; all authors read and approved the final manuscript.

Institutional animal care and use committee statement: The protocols were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (No. 10.0327). The protocols were conducted in accordance with international guidelines for the care and use of laboratory animals. Animal care is described in the manuscript.

Conflict-of-interest statement: To the best of our knowledge, no conflict of interest exists.

Data sharing statement: Technical appendix, statistical code, and dataset available from the corresponding author at schneiderac@gmail.com. Participants gave informed consent for data sharing. No additional data are available.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Correspondence to: Ana Claudia Reis Schneider, PhD, Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350/ata 12214, Porto Alegre, 90035-903 RS, Brazil. schneiderac@gmail.com
Telephone: +55-51-33598847
Fax: +55-51-33598760

Received: July 12, 2016

Peer-review started: July 13, 2016

First decision: October 10, 2016

Revised: October 28, 2016

Accepted: January 11, 2017

Article in press: January 14, 2017

Published online: March 18, 2017

Abstract

AIM

To evaluate the effects of chronic exposure to ethanol in the liver and the expression of inflammatory genes



BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population?



RESEARCH ARTICLE

BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population?

Bárbara Alemar^{1,2}, Cleandra Gregório^{1,2}, Josef Herzog³, Camila Matzenbacher Bittar^{1,2}, Cristina Brinckmann Oliveira Netto⁴, Osvaldo Artigas⁵, Ida Vanessa D. Schwartz^{4,6}, Jordy Coffa⁷, Suzi Alves Camey⁸, Jeffrey Weitzel³, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,4,8*}

1 Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Department of Population Sciences, Division of Clinical Cancer Genomics, City of Hope, Duarte, California, United States of America, **4** Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **5** Hospital Moínhos de Vento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **6** Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **7** MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands, **8** Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* prrolla@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Alemar B, Gregório C, Herzog J, Matzenbacher Bittar C, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigas O, et al. (2017) BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? PLoS ONE 12(11): e0187630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630>

Editor: Amanda Ewart Toland, Ohio State University Wexner Medical Center, UNITED STATES

Received: August 6, 2017

Accepted: October 23, 2017

Published: November 21, 2017

Copyright: © 2017 Alemar et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: We cannot deposit our deep sequencing data in a public repository since we did not obtain consent from the patients submitted to deep sequencing to submit all of their data. Since this data contain sensitive patient information, our Research Ethics Committee (the Institutional Review Board from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre) has imposed this

Abstract

Background

Germline pathogenic variants in *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA*) are the main cause of Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome (HBOC).

Methods

In this study we evaluated the mutational profile and prevalence of *BRCA* pathogenic/likely pathogenic variants among probands fulfilling the NCCN HBOC testing criteria. We characterized the clinical profile of these individuals and explored the performance of international testing criteria.

Results

A pathogenic/likely pathogenic variant was detected in 19.1% of 418 probands, including seven novel frameshift variants. Variants of uncertain significance were found in 5.7% of individuals. We evaluated 50 testing criteria and mutation probability algorithms. There was a significant odds-ratio (OR) for mutation prediction ($p \leq 0.05$) for 25 criteria; 14 of these had $p \leq 0.001$. Using a cutoff point of four criteria, the sensitivity is 83.8%, and the specificity is 53.5% for being a carrier. The prevalence of pathogenic/likely pathogenic variants for