



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Pedro Henrique Fogaça Jordão

Biomarcadores da Carcinogênese no Diagnóstico
Anatomopatológico Diferencial de Neoplasias
Malignas Biliopancreáticas

São José do Rio Preto

2024

Pedro Henrique Fogaça Jordão

Biomarcadores da Carcinogênese no Diagnóstico
Anatomopatológico Diferencial de Neoplasias Malignas
Biliopancreáticas

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi da Silva Souza

São José do Rio Preto

2024

Jordão, Pedro Henrique Fogaça

Biomarcadores da Carcinogênese no Diagnóstico Anatomopatológico Diferencial de Neoplasias Malignas Biliopancreáticas.

São José do Rio Preto, 2024

139 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi da Silva Souza

1. Colangiocarcinoma; 2. Adenocarcinoma Ductal Pancreático; 3. Expressão Gênica;
4. Expressão Proteica.

Pedro Henrique Fogaça Jordão

**Biomarcadores da Carcinogênese no Diagnóstico
Anatomopatológico Diferencial de Neoplasias
Malignas Biliopancreáticas**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Dorotéia Rossi da Silva Souza

2º Examinador: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

3º Examinador: Rita de Cássia Martins Alves da Silva

Suplentes: Patrícia da Silva Fucuta

Tiago Henrique

São José do Rio Preto, 17 de junho de 2024

SUMÁRIO

Dedicatória	viii
Agradecimentos.....	x
Epígrafe.....	xiii
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Quadros.....	xxii
Lista de Tabelas	xxiv
Lista de Anexos	xxvi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xxviii
Resumo.....	xxxiii
Abstract.....	xxxvi
1. INTRODUÇÃO	39
1.1 Neoplasias Malignas Biliopancreáticas: Colangiocarcinoma e Adenocarcinoma Ductal Pancreático	39
1.2 Diagnóstico de Neoplasias Malignas Biliopancreáticas	43
1.2.1 Diagnóstico Diferencial por Imuno-Histoquímica	45
1.3 Biomarcadores Moleculares da Carcinogênese	48
1.3.1 Via PI3K/PTEN e regulação do ciclo celular	48
1.3.2 Via TGF- β /SMAD4 de sinalização e transdução de sinal	52
1.3.3 Via VEGF-A/HIF-1 α /VEGF-R2 na angiogênese mediada por hipóxia.....	55
2. OBJETIVOS.....	61
2.1 Objetivo Geral.....	61
2.2 Objetivos Específicos	61
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	63
3.1 Casuística.....	63
3.2 Métodos.....	64
3.2.1 Extração de RNA Total e RT-qPCR	64
3.2.2 Imuno-histoquímica, Análise de Imagens e Expressão Proteica	66
3.2.3 Análises Estatísticas	71
4. RESULTADOS	74
4.1. Perfil Demográfico e Anatomopatológico.....	74

4.2 Expressão Gênica e Proteica de p110 α (<i>PIK3CA</i>) e PTEN (<i>PTEN</i>)	77
4.3 Expressão Gênica e Proteica de TGF- β 1 (<i>TGFB1</i>) e SMAD4 (<i>SMAD4</i>)	88
4.4 Expressão Gênica e Proteica de VEGF-A (<i>VEGFA</i>), HIF-1 α (<i>HIF1A</i>) e VEGF-R2 (<i>KDR</i>).....	83
4.5 Expressão Gênica e Proteica e Associação com Diferenciação Celular	87
4.6 Expressão Gênica e Proteica e Associação com Invasão Vascular, Linfática Perineural e Metástase	91
4.7 Expressão Gênica e Proteica e Associação com Estadiamento do Câncer	93
4.8 Correlações	95
4.9 Potencial Discriminatório dos Biomarcadores na Classificação Tumoral	97
5. DISCUSSÃO.....	101
5.1 PI3KCA/PTEN.....	101
5.2 SMAD4/TGF- β 1	104
5.3 VEGF-A/VEGF-R2/HIF-1 α	109
6. CONCLUSÕES.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
ANEXOS.....	139

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que enfrentaram, enfrentam e enfrentarão o câncer. Sua força, coragem e determinação nos ensinam diariamente sobre esperança, a importância de nunca desistir e nos inspiram na busca por avanços e soluções.

Também dedico este trabalho à minha família. Tenho convicção de que, sem eles, eu nunca teria chegado até aqui.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, Karina, Fernando e Maria Fernanda, pela paciência e apoio ao longo de toda a minha vida. Nunca me deixaram faltar nada e tenho certeza de que minha jornada foi pavimentada com muito amor e carinho. Sem eles, eu não teria chegado até aqui.

Sou muito grato aos meus companheiros e amigos de laboratório: Rafael, que me deu a oportunidade de iniciar minha carreira como cientista; Maria Clara, que me acolheu em seu projeto de pesquisa durante minha Iniciação Científica; Marcelly, Izabela e Rafinha, pelas brincadeiras, por confiarem em meus ensinamentos incipientes e me ajudarem em toda a parte técnica deste trabalho. Aos demais membros do Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular (NPBIM) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto: Milton e Camila, pelo auxílio e ensinamentos que me deram; Abner, Danúbia, Lucas, Lorena e Livia. Carrego um pouco de cada um de vocês em meu coração! Agradeço ao meu grande amigo Vinícius por tudo. Obrigado também à Ana Clara pela paciência, pelo amor, e por estar ao meu lado durante essa jornada. Te amo!

Agradeço a todos os meus professores, em especial, ao Prof. Dr. Moacir Godoy, pelas conversas, histórias e ensinamentos sobre ciência e estatística, e à Profa. Dra. Heloisa Caldas, pelo acolhimento e carinho que me deu, além de todo suporte técnico que foi imprescindível para a conclusão desse trabalho. Também agradeço ao Prof. Dr. Tiago Henrique e à Profa. Dra. Debora Zuccari pelo apoio técnico e metodológico, e à Dra. Rita de Cássia da Silva e ao Dr. Marcelo Arruda Nakazone pelas contribuições ao delineamento experimental desse trabalho.

Além disso, a ajuda de todos os médicos e profissionais da saúde, em particular dos médicos patologistas: Dra. Eliane Milharcix, pelos ensinamentos e disposição em

auxiliar na coleta dos materiais e interpretação dos resultados; Dr. Rafael Felipe, pela generosidade e Dra. Larissa Eloy, que nos sugeriu o tema deste estudo. Agradeço também à Ingrid Damas e à Dra. Ilka Boin da Universidade Estadual de Campinas por todo apoio.

Importante ressaltar minha gratidão eterna pelos integrantes do Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, em particular, ao Prof. Dr. Sebastião Taboga e ao Prof. Thalles Ruiz pelos ensinamentos, apoio, brincadeiras e por todo suporte técnico e metodológico nas técnicas de imuno-histoquímica e histologia presentes neste trabalho. Se não fossem vocês, seria impossível concluir grande parte desta pesquisa.

Em especial, quero expressar minha profunda gratidão à minha orientadora, Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza, pela sua orientação incansável, sabedoria e apoio durante este trabalho que foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional. Obrigado por compartilhar seus conhecimentos, experiências e pelo carinho com que conduziu cada etapa deste estudo. Sou imensamente grato por ter a oportunidade de aprender com você.

Por fim, mas de igual importância, agradeço aos pacientes incluídos neste estudo por me ter sido possível utilizar seus dados e amostras. Ressalto meu imenso respeito por todos vocês!

Processo nº 2022/01832-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Epígrafe

EPÍGRAFE

*“A ciência é uma forma de pensar muito mais
do que um corpo de conhecimentos.”*

Carl Sagan

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Via PI3K/PTEN de regulação do ciclo celular. Estímulos ativam p110 α (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa), que catalisa a conversão de PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) em PIP₃ (fosfatidilinositol-3-fosfato). PIP₃ ativa AKT (proteína quinase B), afetando funções celulares. A proteína PTEN (fosfatase e homólogo de tensina) regula PIP₃. Feita em Biorender.com. **51**
- Figura 2.** Via TGF- β /SMAD4 de sinalização e transdução de sinal. TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta 1) se liga ao receptor T β -R (receptor para o fator de crescimento transformador beta) do tipo II. O complexo T β -RI fosforila SMAD (*mothers against decapentaplegic homolog*) 2/3, que, em conjunto com SMAD4, transloca-se para o núcleo. Em seguida, ligam-se ao SBE (elemento de ligação à SMAD) para recrutar fatores transcricionais relacionados à supressão tumoral. Feita em Biorender.com. **54**
- Figura 3.** Mecanismos de regulação da angiogênese tumoral. A ativação do VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) promove a mitose e permeabilidade das células endoteliais, enquanto a sinalização *notch* induz as células de ponta a formarem filopódios em resposta ao VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A). O aumento da sinalização *notch* resulta na redução da expressão de VEGF-R2, estabelecendo um *feedback* negativo regulatório. Adaptada de Biorender.com. **59**
- Figura 4.** Marcações imuno-histoquímicas de tecidos controle positivos para VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A), HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 alfa), VEGF-R2 (receptor **70**

2 do fator de crescimento endotelial vascular), p110 α (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa), PTEN (fosfatase e homólogo de tensina), SMAD4 (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta 1). As barras de tamanho representam 20 μ m.

Figura 5. (A) Comparação da expressão gênica de *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina) em adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), subtipos de colangiocarcinoma extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA). Barras representam média e erro padrão. (B) Padrão mais frequente de marcação na análise imuno-histoquímica de p110 α (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e PTEN em ACDP, eCCA, iCCA, ducto pancreático não neoplásico (DPNN) e ducto biliar não neoplásico (DBNN). As barras de tamanho representam 20 μ m. (C) Comparação da expressão proteica de p110 α e PTEN em ACDP, eCCA, iCCA, DPNN e DBNN. A cruz branca representa média. 79

Figura 6. (A) Comparação da expressão gênica de *SMAD4* (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e *TGFB1* (fator de crescimento transformador beta 1) adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), subtipos de colangiocarcinoma extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA). Barras representam média e erro padrão. (B) Padrão mais frequente de marcação na análise imuno-histoquímica de SMAD4 e TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta 1) em ACDP, eCCA, iCCA, ducto pancreático não neoplásico (DPNN) e ducto biliar não neoplásico (DBNN). As barras de tamanho representam 20 μ m. 82

(C) Comparação da expressão proteica de SMAD4 e TGF- β 1 em ACDP, eCCA, iCCA, DPNN e DBNN. A cruz branca representa média.

Figura 7. (A) Comparação da expressão gênica de *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A), *HIF1A* (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e *KDR* (receptor com domínio de inserção de quinase) em adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), subtipos de colangiocarcinoma extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA). Barras representam média e erro padrão. (B) Padrão mais frequente de marcação na análise imuno-histoquímica de VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A), HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) em ACDP, eCCA, iCCA, ducto pancreático não neoplásico (DPNN) e ducto biliar não neoplásico (DBNN). As barras de tamanho representam 20 μ m. (C) Comparação da expressão proteica de VEGF-A, HIF-1 α e VEGF-R2 em ACDP, eCCA, iCCA, DPNN e DBNN. A cruz branca representa média. **86**

Figura 8. Expressão gênica de *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A), *HIF1A* (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e *KDR* (receptor com domínio de inserção de quinase) e proteica de VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A) HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) para cada tipo de diferenciação celular em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). A cruz branca representa média. **88**

- Figura 9.** (A–D) Expressão gênica de *SMAD4* (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e *TGFB1* (fator de crescimento transformador beta 1) e proteica de SMAD4 e TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta 1) para cada tipo de diferenciação celular em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). A cruz branca representa média. (E) Padrão de marcação de TGF- β 1 em amostras moderadamente diferenciadas de ACDP, eCCA e iCCA. As barras de tamanho representam 20 μ m. **89**
- Figura 10.** Expressão gênica de *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina) e proteica de p100 α (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e PTEN para cada tipo de diferenciação celular em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). A cruz branca representa média. **90**
- Figura 11.** (A–D) Expressão gênica de *TGFB1* (fator de crescimento transformador beta 1) para cada tipo de invasão e metástase em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). (E–F) Expressão proteica de TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta 1) em invasão perineural e metástase em ACDP, eCCA e iCCA. A cruz branca representa média. **92**
- Figura 12.** Expressão gênica de *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A), *TGFB1* (fator de crescimento transformador beta **94**

1) e *KDR* (receptor com domínio de inserção de quinase) e proteica de VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) para cada estadiamento em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). A cruz branca representa média.

Figura 13. Gráficos de dispersão e coeficientes de correlação de Spearman (R) para correlação entre expressão genica de *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina), *SMAD4* (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e *TGBF1* (fator de crescimento transformador beta 1), *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A) e *HIF1A* (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e *KDR* (receptor com domínio de inserção de quinase) em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). As sombras indicam intervalo de confiança de 95%. **96**

Figura 14. Curva ROC (Característica de Operação do Receptor) do potencial discriminatório da expressão gênica e proteica de biomarcadores da carcinogênese para classificação de adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), e colangiocarcinoma dos subtipos extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA). *TGFB1* e TGF- β 1 = fator de crescimento transformador beta 1. *VEGFA* e VEGF-A = fator de crescimento endotelial vascular A. *HIF1A* = fator induzível por hipóxia 1 alfa), *KDR* = receptor com domínio de inserção de **99**

kinase. SMAD4 = *mothers against decapentaplegic homolog*
4.

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Tampões, temperaturas e tempos utilizados nas etapas de recuperação antigênica, bloqueio de proteínas inespecíficas, revelação com DAB (3,3'-diaminobenzidina) e contra coloração com hematoxilina para cada proteína analisada por meio de imuno-histoquímica.	70
------------------	---	-----------

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Perfil demográfico de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) e colangiocarcinoma dos subtipos extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA), ducto pancreático não neoplásico (DPNN) e ducto biliar não neoplásico (DBNN).	75
Tabela 2.	Características anatomopatológicas de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) e colangiocarcinoma dos subtipos extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA).	76
Tabela 3.	Valores de ponto de corte (<i>cutoff</i>), área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% (IC 95%), sensibilidade e especificidade para o potencial discriminatório das expressões gênicas e proteicas de biomarcadores da carcinogênese para classificação de adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) e colangiocarcinoma dos subtipos extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA).	98

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Painel do padrão de marcação imuno-histoquímica de adenocarcinoma ductal pancreático (A), subtipos de colangiocarcinoma extra (e) e intra-hepático (i), ducto pancreático não neoplásico (P) e ducto biliar não neoplásico (B) para p110 α (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa), PTEN (fosfatase e homólogo de tensina), SMAD4 (mothers against decapentaplegic homolog 4), TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta 1), VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A), HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular).	139
-----------------	---	------------

Lista de Abreviaturas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µl	Microlitro
µm	Micrometros
ACDP	Adenocarcinoma ductal pancreático
ACTB	Actina beta
AKT	Proteína quinase B
αPKC-ι	Proteína quinase C atípica iota
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
BMP5	Proteína morfogenética óssea 5
BSA	Albumina sérica bovina
CA 19-9	Antígeno carboidrato 19-9
CAFS	Fibroblastos associados ao câncer
CCA	Colangiocarcinoma
cDNA	DNA complementar
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	Citoqueratina
CK7	Citoquetarina 7
CK17	Citoquetarina 17
CK19	Citoqueratina 19
CK20	Citoquetarina 20
circRNA	RNA circular

DBNN	Ducto biliar não neoplásico
DLL4	Delta-like 4
DAB	3,3'-diaminobenzidina
dCCA	Colangiocarcinoma distal
DPNN	Ducto pancreático não neoplásico
eCCA	Colangiocarcinoma extra-hepático
EP	Erro padrão
Espec.	Especificidade
E-caderina	Caderina epitelial
FOLFIRINOX	5-Fluorouracil, leucovorina, oxaliplatina e irinotecano
FC	<i>Fold-change</i>
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FFPE	Tecido fixado em formalina e embebido em parafina
HB	Hospital de Base
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HIF	Fatores induzíveis por hipóxia
HIF-1α	Fator induzível por hipóxia 1 alfa
HIF1A	Fator induzível por hipóxia 1, subunidade alfa
HuR	Antígeno humano R
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-6	Interleucina-6
INHBE	Subunidade beta E da inibina

iCCA	Colangiocarcinoma intra-hepático
KDR	Receptor do domínio de inserção da quinase
Log2FC	Log2 <i>fold-change</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
M	Média
mm	Milímetro
Mdn	Mediana
miRNA	MicroRNA
ML	<i>Machine Learning</i>
MUC1	Mucina 1
MUC4	Mucina 4
MUC5AC	Mucina-5AC
ng	Nanograma
N-caderina	Caderina neural
PBS	Tampão fosfato-salino
pCCA	Colangiocarcinoma peri-hilar
pH	Potencial hidrogeniônico
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase 1
PH	Homologia pleckstrin
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PIK3CA alfa	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol-3-fosfato
pVHL	Supressor de tumor de Von Hippel-Lindau

PTEN	Fosfatase e homólogo de tensina
R	Coeficiente de correlação de Spearman
ROC	Característica de Operação do Receptor
RPLP0	Subunidade P0 da proteína ribossômica do pedúnculo lateral
S100P	Proteína P de ligação ao cálcio S100
SBE	Elemento de ligação à SMAD
Ser473	Serina na posição 473
Ser59	Serina na posição 59
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
Sp1	Proteína de especificidade 1
TA	Temperatura ambiente
TGFB1	Fator de crescimento transformador beta 1
TGF-β1	Fator de crescimento transformador beta 1
Thr308	Treonina na posição 308
THBS2	Trombospondina-2
Tβ-RI	Receptor para o fator de crescimento transformador beta do tipo I
Tβ-RII	Receptor para o fator de crescimento transformador beta do tipo II
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGF-R2	Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
WT1	Proteína tumoral de Wilms
Y1175	Resíduo de tirosina na posição 1175

Resumo

RESUMO

Introdução – O adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) e o colangiocarcinoma (CCA), classificado em extra-hepático (eCCA) e intra-hepático (iCCA), são neoplasias malignas biliopancreáticas, com desafio no diagnóstico diferencial pelas semelhanças anatomopatológicas. **Objetivos** – Analisar expressão gênica e proteica das vias da carcinogênese PIK3CA/PTEN, SMAD4/TGF- β 1 e VEGF-A/VEGF-R2/HIF-1 α em CCA e ACDP e a associação com características anatomopatológicas, visando identificar marcadores para diagnóstico diferencial. **Casística e Métodos** – Foram estudados 67 indivíduos: 22 pacientes com ACDP, 17 com eCCA e 13 com iCCA; e controles sem neoplasias: sete amostras de tecido do ducto biliar (DBNN) e oito de tecido do ducto pancreático (DPNN). Para análise de expressão gênica (RT-qPCR) e proteica (imunohistoquímica/ImageJ/HistoScore) foram utilizadas amostras de tecido fresco ou embocado em parafina. Admitiu-se valor significativo para $P < 0,05$. **Resultados** – Houve semelhança para sexo e idade entre os pacientes, mas mostraram maior faixa etária versus controles ($P < 0,05$). Prevaleceu estadiamento I/II para ACDP e III/IV para CCA e invasão linfática em ACDP ($P < 0,05$), tumor moderadamente diferenciado destacou-se em todos os grupos. Observou-se superexpressão gênica de *PIK3CA*, *PTEN*, *SMAD4*, *TGFB1*, *VEGFA* e *KDR* nos pacientes versus controles ($P < 0,02$), enquanto *HIF1A* foi superexpresso apenas em iCCA ($P = 0,006$). No entanto, observamos semelhança entre pacientes, exceto para *TGFB1*, aumentado em iCCA versus ACDP e eCCA, assim como *VEGFA* e *KDR* em iCCA versus ACDP ($P < 0,05$). A marcação proteica de p110 α e PTEN apresentou predominância citoplasmática em todos os grupos tumorais. Por outro lado, SMAD4 mostrou negatividade na maioria dos grupos, embora eCCA tenha apresentado

predominância para marcação citoplasmática. Ainda, TGF- β 1 apresentou expressão proteica notavelmente mais acentuada em ACDP do que os demais tipos de câncer. VEGF-A, VEGF-R2 e HIF-1 α mostraram padrões variáveis de marcação entre os grupos, com destaque para negatividade de HIF-1 α em iCCA. A expressão proteica foi semelhante entre os grupos, entretanto, houve diferença ($P < 0,05$) na expressão gênica e proteica para: diferenciação celular pouco (*HIF1A* e *TGFB1*: iCCA > ACDP) e moderadamente diferenciadas (*KDR* e *TGFB1*: iCCA > ACDP); invasão vascular, linfática e perineural (*TGFB1*: iCCA > ACDP); perineural (TGF- β -1: ACDP > eCCA); metástase (TGF- β -1: ACDP > iCCA) e estadiamento III/IV (*VEGFA*, *TGFB1*, *KDR*: iCCA > ACDP; *TGFB1*: iCCA > eCCA; VEGF-R2: ACDP > eCCA). Observou-se correlação positiva ($P < 0,05$) moderada entre *PIK3CA* e *PTEN* em eCCA e iCCA; *SMAD4* e *TGFB1* em ACDP e iCCA; e *VEGFA* e *HIF1A* em ACDP e eCCA, e forte em iCCA. A análise discriminatória revelou que a expressão gênica de *TGFB1* teve o melhor desempenho na diferenciação de iCCA de ACDP. Para a classificação entre iCCA e eCCA, *TGFB1* e *VEGFA* foram os melhores indicadores. A expressão proteica de TGF- β 1 e SMAD4 foi clinicamente relevante para diferenciar o eCCA do ACDP. **Conclusões** – A expressão gênica e proteica diferencial destes biomarcadores associa-se às características anatomopatológicas em neoplasias malignas biliopancreáticas. A expressão proteica de SMAD4 e TGF- β 1 apresenta-se com potencial para discriminar e classificar estas doenças.

Palavras-chave: Colangiocarcinoma; Adenocarcinoma Ductal Pancreático; Expressão Gênica; Expressão Proteica.

Abstract

ABSTRACT

Introduction – Pancreatic ductal adenocarcinoma (ACDP) and cholangiocarcinoma (CCA), classified as extrahepatic (eCCA) and intrahepatic (iCCA), are biliopancreatic malignant neoplasms, posing a challenge in differential diagnosis due to their anatomopathological similarities. **Objectives** – To analyze gene and protein expression of the carcinogenesis pathways PIK3CA/PTEN, SMAD4/TGF- β 1, and VEGF-A/VEGF-R2/HIF-1 α in CCA and ACDP, and their association with anatomopathological characteristics, aiming to identify markers for differential diagnosis. **Casuistry and Methods** – A total of 67 individuals were studied: 22 patients with ACDP, 17 with eCCA, and 13 with iCCA; and controls without neoplasms: seven samples of biliary duct tissue (BDNN) and eight of pancreatic duct tissue (PDNN). For gene (RT-qPCR) and protein (immunohistochemistry/ImageJ/HistoScore) expression analysis, fresh or paraffin-embedded tissue samples were used. A significant value was considered for $P < 0.05$. **Results** – There was a similarity in sex and age among patients, but they showed a higher age range compared to controls ($P < 0.05$). Stage I/II prevailed in ACDP and III/IV in CCA, with lymphatic invasion in ACDP ($P < 0.05$). Moderately differentiated tumors predominated in all groups. Gene overexpression of *PIK3CA*, *PTEN*, *SMAD4*, *TGFB1*, *VEGFA*, and *KDR* was observed in patients versus controls ($P < 0.02$), while *HIF1A* was overexpressed only in iCCA ($P = 0.006$). However, similarity was observed among patients, except for *TGFB1*, which was increased in iCCA versus ACDP and eCCA, as well as *VEGFA* and *KDR* in iCCA versus ACDP ($P < 0.05$). Protein marking of p110 α and PTEN showed cytoplasmic predominance in all tumor groups. On the other hand, SMAD4 was negative in most groups, although eCCA showed predominance for

cytoplasmic marking. Additionally, TGF- β 1 protein expression was notably more pronounced in ACDP than in other cancer types. VEGF-A, VEGF-R2, and HIF-1 α exhibited variable marking patterns among groups, with HIF-1 α negativity highlighted in iCCA. Protein expression was similar among groups; however, there was a difference ($P < 0.05$) in gene and protein expression for: poorly differentiated cells (*HIF1A* and *TGFB1*: iCCA > ACDP) and moderately differentiated cells (*KDR* and *TGFB1*: iCCA > ACDP); vascular, lymphatic, and perineural invasion (*TGFB1*: iCCA > ACDP); perineural (TGF- β 1: ACDP > eCCA); metastasis (TGF- β 1: ACDP > iCCA), and stage III/IV (*VEGFA*, *TGFB1*, *KDR*: iCCA > ACDP; *TGFB1*: iCCA > eCCA; VEGF-R2: ACDP > eCCA). A moderate positive correlation ($P < 0.05$) was observed between *PIK3CA* and *PTEN* in eCCA and iCCA; *SMAD4* and *TGFB1* in ACDP and iCCA; and *VEGFA* and *HIF1A* in ACDP and eCCA, and strong in iCCA. Discriminatory analysis revealed that *TGFB1* gene expression had the best performance in differentiating iCCA from ACDP. For classification between iCCA and eCCA, *TGFB1* and *VEGFA* were the best indicators. TGF- β 1 and SMAD4 protein expression was clinically relevant for differentiating eCCA from ACDP. **Conclusions** – The differential gene and protein expression of these biomarkers is associated with the anatomopathological characteristics in biliopancreatic malignant neoplasms. SMAD4 and TGF- β 1 protein expression shows potential for discriminating and classifying these diseases.

Keywords: Cholangiocarcinoma; Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; Gene Expression; Protein Expression.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias Malignas Biliopancreáticas: Colangiocarcinoma e Adenocarcinoma Ductal Pancreático

O sistema biliopancreático é constituído pelo trato biliar, pâncreas e ductos subdivididos em ductos biliares intra-hepáticos e extra-hepáticos, além de vesícula biliar. É formado por tecido conjuntivo fibroso denso e seu lúmen revestido por uma única camada de epitélio simples cuboidal a colunar alto, cujas células são chamadas de colangiócitos (1–3). O trato biliar é responsável por secretar e absorver diversas substâncias, como água e eletrólitos, assim como, modificar a fluidez e transportar a bile (2,4). Por outro lado, o pâncreas possui um complexo sistema de ductos, revestidos por células epiteliais ductais pancreáticas, que atuam transportando enzimas digestivas, que são produzidas pelas células epiteliais acinares (5).

Dentre as neoplasias malignas biliopancreáticas, destacam-se o colangiocarcinoma (CCA) e o adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), cujas semelhanças anatomopatológicas dificultam o diagnóstico diferencial devido às suas origens embrionárias em comum, sobreposição anatômica e analogias fenotípicas (1,6). Caracterizado como um grupo heterogêneo de tumores malignos que se originam das células epiteliais dos ductos biliares, CCA subdivide-se nos tipos intra-hepático (iCCA) e extra-hepático (eCCA) que inclui o colangiocarcinoma perihilar (pCCA), quando ocorre próximo ao hilo hepático, e distal (dCCA), posicionando-se mais abaixo no colédoco, próximo ao pâncreas (7,8). Estes três subtipos juntos correspondem a aproximadamente 3% das neoplasias gastrointestinais. São o segundo tipo mais frequente de câncer primário de fígado (8), sendo que cada subtipo tem fatores de risco, sinais clínicos, tratamento e prognóstico distintos (8,9).

Destacam-se como principais fatores de risco para CCA, as infecções pelos vírus da hepatite B e C, sendo este último mais especificamente associado ao iCCA. Além disso, a presença de hepatolitíase, malformações congênitas e cistos no trato biliar, bem como, a síndrome metabólica, também aumentam o risco para essa doença. Embora menos comuns no Brasil, a infecção por vermes hepáticos e a colangite esclerosante primária também estão associadas ao desenvolvimento do CCA. Em relação aos hábitos de vida, tabagismo e o alcoolismo são cofatores significativos para o surgimento da doença. Adicionalmente, fatores ambientais, como a ingestão de alimentos contaminados por nitrosaminas e a exposição a substâncias como amianto, dioxinas e cloretos de vinila, também estão relacionados ao aumento do risco de CCA (10).

Embora seja um câncer raro, a incidência e a mortalidade por CCA aumentou no mundo todo nas últimas décadas (7). É geralmente diagnosticado em estágios avançados, devido à falta de sintomas específicos na fase inicial e ausência de estratégias de rastreamento (11). Contudo, eCCA causa icterícia como sintoma principal, o que ocorre devido à obstrução das vias extra-hepáticas e retenção da bile. Por outro lado, icterícia é característica de iCCA em estágios mais avançados. Outros sintomas de CCA em estágios avançados incluem dor abdominal, náusea, perda de peso e anorexia (7,12).

O microambiente tumoral de CCA é caracterizado por diversos tipos de células e componentes acelulares (13). A matriz extracelular é constituída principalmente de colágeno, fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e uma variedade de células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos e células T (14). Interações entre o microambiente tumoral e o epitélio tumoral favorecem a proliferação celular e o crescimento do tumor, em especial, pela atuação dos CAFs (7). Desse modo, é possível que o ambiente tumoral surja em decorrência do microambiente regenerativo durante a

reparação dos ductos biliares, de maneira semelhante a outras doenças pré-malignas como a colangite esclerosante primária e fibrose hepática congênita (15).

Quanto às características microscópicas, CCA classifica-se como adenocarcinoma produtor de muco e apresenta estroma desmoplásico associado a reações inflamatórias (16). Além disso, em nível histológico, CCA é semelhante a outros adenocarcinomas metastáticos com origem primária extrabiliar, como por exemplo o pâncreas, o que dificulta o diagnóstico por exames histopatológicos, visto que ainda não há painéis de marcadores imuno-histoquímicos específicos para essa doença (11).

O tratamento padrão para CCA é a ressecção cirúrgica, embora seja reservada apenas para iCCA e pCCA. O diagnóstico e tratamento do subtipo dCCA são semelhantes aos tipos de câncer da cabeça do pâncreas. A probabilidade de sobrevida em cinco anos, após a ressecção não ultrapassa 40% (17). Em relação ao tratamento quimioterápico, a maioria dos pacientes com dCCA é tratada com gemcitabina e uma pequena parcela com gemcitabina e cisplatina em conjunto (18). Adicionalmente, diversas outras terapias para essa doença estão sendo estudadas (17).

A propósito, destaca-se entre os adenocarcinomas de pâncreas, o ACDP que se origina das células epiteliais dos ductos pancreáticos, cuja incidência tem aumentado nos últimos anos, sendo mais comum em idosos (19,20). Representando mais de 90% dos casos de câncer de pâncreas, geralmente, é diagnosticado em estágios avançados, com metástases já presentes. Devido às respostas inadequadas ao tratamento, a sobrevida dos pacientes é geralmente inferior a um ano, tornando-o a sétima causa de morte por câncer no mundo (19,20). No Brasil, é estimado cerca de 80 mil mortes por câncer pancreático entre 2025 e 2029 (21). Portanto, é fundamental o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de detecção, diagnóstico e tratamento para essa doença.

A maioria dos pacientes é considerada inoperável no momento do diagnóstico, devido ao estágio avançado e à presença de metástases. Alguns sintomas comuns incluem dor nas costas, perda de peso e apetite, início de diabetes e icterícia indolor (20,22). Para avaliar lesões pancreáticas sólidas são utilizados exames de imagem como ressonância magnética, tomografia computadorizada e ultrassonografia endoscópica. No entanto, os exames histopatológicos continuam sendo o padrão-ouro no diagnóstico dessa doença (20,22).

No que diz respeito aos aspectos histopatológicos, o ACDP geralmente apresenta estruturas ductais e glandulares envoltas por um estroma denso e desmoplásico, juntamente com outros componentes não celulares (20,22,23). O microambiente tumoral de ACDP é altamente heterogêneo, caracterizado pela presença de CAFs, células pancreáticas estreladas e diversas células do sistema imunológico (23). Embora ainda seja objeto de debate se o microambiente tumoral promove ou reduz a progressão do câncer e a resistência às terapias; os fibroblastos associados ao câncer desempenham um papel importante na redução da apoptose e no estímulo à proliferação e migração das células cancerosas (22,23).

Além disso, a presença de células T reguladoras, macrófagos e células supressoras derivadas de mieloides contribui para a criação de um ambiente imunossupressor, inibindo a função dos linfócitos T CD8, que reconhecem e eliminam as células cancerosas (23). Adicionalmente, as células do microambiente tumoral interagem entre si e secretam fatores de crescimento como TGF (fator de crescimento transformador) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (22). Assim, a compreensão dos fatores envolvidos no microambiente tumoral do ACDP, bem como, seus mecanismos de ação, podem

contribuir para a identificação de biomarcadores diagnósticos e o desenvolvimento de novas terapias.

No contexto do ACDP, a ocorrência de metástases distantes é facilitada devido à localização abdominal central do pâncreas, à ausência de uma cápsula de órgão definida e à presença de vasos circundantes (5,22). Para ser considerado um adenocarcinoma invasivo, são necessários critérios como a disposição aleatória de glândulas neoplásicas, invasão vascular e perineural, variação nuclear em uma única glândula, presença de mitoses atípicas, entre outros (20).

Considerado padrão ouro, a maioria dos pacientes com ACDP recebe como tratamento quimioterapia baseada apenas em gemcitabina (18). No entanto, tratamentos recentes que incluem a combinação de gemcitabina com nab-paclitaxel têm mostrado significativo aumento na sobrevida de pacientes em estágio IV. Além disso, evidências apontam o FOLFIRINOX (5-fluorouracil, leucovorina, oxaliplatina e irinotecano) como a terapia quimioterápica mais eficaz para o tratamento de ACDP avançado e metastático (22).

1.2 Diagnóstico de Neoplasias Malignas Biliopancreáticas

O diagnóstico distinto entre ACDP e CCA é de extrema importância para a definição das opções terapêuticas. Pacientes com diagnóstico ambíguo podem não receber o tratamento ideal, resultando na falta de benefícios esperados do tratamento (24). Devido às suas origens embrionárias em comum, sobreposição anatômica e analogias fenotípicas, ACDP e CCA compartilham diversas características histopatológicas (6,25). Entre os subtipos de CCA, o extra-hepático dCCA é o mais difícil de diferenciar do ACDP, muitas vezes sendo tratado como uma única entidade. No entanto, trata-se de

doenças distintas, com características diferentes, como prognóstico mais favorável para o dCCA em relação ao ACDP e benefícios associados à terapia adjuvante no ACDP, mas não no dCCA. Isso corrobora a não aplicabilidade dos mesmos tratamentos para ambas as doenças, embora as abordagens cirúrgicas sejam semelhantes, exigindo estratégias de manejo distintas (18). Desse modo, apesar das tecnologias de análises ômicas ampliarem o conhecimento sobre estas doenças, revelando perfis genômicos e transcricionais com diversas diferenças, algumas similaridades em nível molecular ainda necessitam ser esclarecidas (6).

Nesse contexto, embora não existam marcadores definitivos para diferenciar ACDP de estruturas ductais benignas, o biomarcador mais utilizado para auxiliar o diagnóstico de ACDP é o antígeno carboidrato 19-9 (CA 19-9). No entanto, há várias desvantagens associadas, incluindo resultados falso-positivos em pacientes com icterícia por obstrução dos ductos biliopancreáticos devido a doenças benignas (20,26–28) ou condições como tireoidite, diabetes mellitus e doenças autoimunes (27). Além disso, os valores de sensibilidade e especificidade do CA 19-9 são limitados (28,29). Estudos recentes exploram alternativas, como a combinação do CA 19-9 com outros marcadores, mas conclusões definitivas ainda não foram alcançadas (26). O CA 19-9, em conjunto com o antígeno carcinoembrionário (CEA), também é utilizado para monitorar a resposta à terapia em cânceres biliar (28). Por fim, a perda da expressão do supressor tumoral SMAD4 (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e expressão aberrante de p53 (proteína de tumor 53), embora não sejam exclusivas desse tipo de câncer, estão presentes em mais de 50% dos ACDPs e associadas a pior prognóstico (20,23).

Adicionalmente, a análise da expressão sérica da trombospondina-2 (THBS2), uma glicoproteína com implicações na angiogênese e apoptose, juntamente com o

marcador CA 19-9, mostrou potencial no diagnóstico diferencial entre ACDP e dCCA, em comparação com indivíduos saudáveis ou com lesões benignas, que exibiram níveis reduzidos para ambos os biomarcadores. No entanto, foi observada semelhança na expressão sérica de THBS2 e CA 19-9 entre pacientes com dCCA e ACDP (30).

Exames de imagem como a ultrassonografia transabdominal, tomografia computadorizada e ressonância magnética são a primeira abordagem não invasiva para avaliação de pacientes com icterícia e diagnóstico de causas de obstrução dos ductos biliares (31). Entretanto, o diagnóstico de CCA utilizando abordagens não invasivas é impreciso, sendo necessária confirmação histológica (7).

Ainda nesse contexto, um estudo identificou 236 metabólitos séricos alterados em pacientes com eCCA e 280 em ACDP quando comparados aos controles. Além disso, mais de 60 metabólitos séricos estavam alterados na comparação entre eCCA e ACDP, com este último apresentando níveis mais elevados. Entretanto, as expressões com diferenças significativas demonstraram valores de sensibilidade e especificidade medianos, destacando a necessidade de validação de suas utilidades clínicas (28).

1.2.1 Diagnóstico diferencial por imuno-histoquímica

No diagnóstico de rotina empregando imuno-histoquímica, os biomarcadores mais comumente utilizados são o antígeno carcinoembrionário (CEA), citoqueratinas (CK) CK7, CK20 e CA 19-9, juntamente com características clínicas e histológicas. No entanto, todos esses marcadores são expressos de forma similar, ou muito variável no caso de CK20, em CCA e ACDP, o que dificulta a distinção entre estas neoplasias malignas (20,25,32,33).

Outros biomarcadores têm sido estudados com o objetivo de definir um painel mais específico para diferenciar estas doenças. A mucina 1 (MUC1), por exemplo, é um marcador que promove adesão celular em tecidos estranhos e não é expressa em ductos biliares normais, mas possui alta expressão em eCCA e neoplasias intraepiteliais pancreáticas. Embora possa ser utilizado para mapear a progressão do tecido tumoral, não é capaz de diferenciar CCA de ACDP. O mesmo padrão é observado para a mucina 4 (MUC4) (20,25).

Ainda, um estudo demonstrou que a caderina neural (N-caderina) apresentou expressão diminuída em metástases de ACDP em fígado em comparação com CCA, o que poderia auxiliar na diferenciação dessas doenças em conjunto com outros biomarcadores, embora com confiabilidade a ser confirmada. Contudo, o estudo em questão não discriminou os subtipos de CCA durante a análise (34). Outros autores realizaram essa distinção e observaram expressão significativamente reduzida de N-caderina em metástases hepáticas de ACDP, quando comparado à iCCA. Entretanto, houve semelhança entre ACDP e eCCA. O mesmo estudo demonstrou que a caderina epitelial (E-caderina), outro membro da família das caderinas, apresenta expressão semelhante para ACDP e todos os subtipos de CCA (33).

Ainda neste contexto, S100P (proteína P de ligação ao cálcio S100) é uma proteína que desempenha um papel na diferenciação e proliferação celular e foi identificada como altamente específica para tumores biliopancreáticos. Todavia, tanto eCCA quanto ACDP apresentam semelhanças na expressão desta proteína (25). Por outro lado, um estudo mostrou que o uso em conjunto dos marcadores S100P, pVHL (supressor de tumor de Von Hippel-Lindau), MUC5AC (mucina-5AC) e CK17 pode ser útil no diagnóstico diferencial de iCCA e ACDP, embora o subtipo extra-hepático não tenha sido

considerado (35). Outro estudo também sugeriu a proteína anexina (ANXA) A10 como um biomarcador na discriminação entre iCCA e ACDP, no entanto, não incluiu os outros subtipos de CCA (36).

Ainda, outros pesquisadores observaram sensibilidade e especificidade em torno de 35–66% para ANXA10 na diferenciação de iCCA, ACDP e vice-versa, em metástases hepáticas. Outros biomarcadores estudados (ANXA1 e ANXA13) não mostraram capacidade de diferenciar as neoplasias malignas. É possível que, se interpretados em conjunto, esses biomarcadores possam se tornar candidatos ao diagnóstico diferencial de iCCA e ACDP. No entanto, são necessários mais estudos que incluam o subtipo eCCA em suas análises (37). Ainda, nesse contexto, um estudo comparou a expressão de ANXA10 entre dCCA e câncer de cabeça do pâncreas e descobriu menor frequência de positividade desse marcador em dCCA, assim como de CK17. Nesse caso, o valor para sensibilidade e especificidade de CK17 para discriminação entre câncer de cabeça do pâncreas e dCCA foi em torno de 70%, enquanto para ANXA10 variou de 80% a 50%, respectivamente. No entanto, são necessários outros estudos para validar esses resultados (24).

Outro estudo, empregando o método *Machine Learning* (ML) para análise de dados, demonstrou que CK7, CK19, BerEP4 (molécula de adesão de células epiteliais) e CEA policlonal, quando combinados com MUC1 e CA19-9, podem caracterizar o perfil imuno-histoquímico de iCCA. Além disso, sugeriu que WT1 (proteína tumoral de Wilms) poderia ser um marcador diferencial para iCCA (38). No entanto, esses resultados também necessitam de validação por meio de outros estudos. Além disso, a caracterização exclusiva do perfil imuno-histoquímico de iCCA não é suficiente para distinguir eCCA de ACDP, o que continua sendo o principal desafio deste campo de estudo.

Desse modo, é reconhecido que o microambiente tumoral desempenha um papel crucial na carcinogênese de CCA e ACDP. O estudo do perfil molecular do ambiente tumoral pode contribuir na identificação de biomarcadores para diagnóstico e a criação de tratamentos personalizados para essas doenças (20,39). Em resumo, até o momento, os resultados conclusivos para a definição de um painel imuno-histoquímico ou marcadores isolados para diferenciar ACDP de CCA, especialmente, o subtipo extra-hepático, são escassos. Compreender os mecanismos envolvidos na carcinogênese e suas ações no microambiente tumoral pode contribuir para a identificação de novos marcadores para o diagnóstico diferencial dessas doenças.

1.3 Biomarcadores Moleculares da Carcinogênese

1.3.1 Via PI3K/PTEN e regulação do ciclo celular

O ciclo celular consiste em uma série de eventos de extrema importância para o desenvolvimento de organismos e suas condições patológicas. Neste contexto, a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) é uma família de enzimas que atuam em diversas funções do ciclo celular, como diferenciação, crescimento, motilidade, proliferação e sobrevivência celular, que, por sua vez, estão diretamente relacionadas à carcinogênese. A desregulação e sinalização exacerbada de PI3K estão associadas a uma variedade de doenças, tais como diabetes, distúrbios neurológicos e imunológicos, doenças cardiovasculares, crescimento descontrolado de tecidos e câncer (40,41).

A família PI3K é dividida em quatro classes, com base em sua estrutura e função, variando de I a IV, sendo a Classe I subdividida em duas subclasses, PI 3-quinases de classe IA e PI 3-quinases de classe IB. A subclasse PI 3-quinases de classe IA é composta por três subunidades catalíticas e cinco subunidades regulatórias. Entre as subunidades

catalíticas, destaca-se a enzima $p110\alpha$, uma proteína citoplasmática oncogênica codificada pelo gene *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa), localizado na posição 3q26.32 do genoma humano. Em resposta a estímulos de diversos fatores de crescimento ou oncogenes, essa proteína, em complexo com p85, sua subunidade regulatória, utiliza ATP (adenosina trifosfato) para catalisar a fosforilação do anel de inositol de PIP_2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), um lipídio presente na membrana celular e no complexo de Golgi, pertencente à família dos fosfatidilinositóis. Essa família está envolvida na organização de vias de sinalização, dinâmicas do citoesqueleto, regulação do tráfego intracelular, entre outras funções celulares (40–43). Como resultado da fosforilação, PIP_3 (fosfatidilinositol-3-fosfato) é formado (**Figura 1**).

Em seguida, PIP_3 atua como segundo mensageiro ao se ligar ao domínio PH (homologia pleckstrin) de AKT (proteína quinase B), causando fosforilação na Thr308 (treonina na posição 308) pela proteína PDK1 (piruvato desidrogenase quinase 1) e na Ser473 (serina na posição 473) por mTORC2 (complexo mTOR 2). Por fim, AKT tem diversos alvos envolvidos em diversas funções como metabolismo, crescimento, sobrevivência, proliferação, apoptose, motilidade e migração de células cancerígenas (40,41,43) (**Figura 1**).

Nesse contexto, em condições celulares normais, PIP_3 é rapidamente metabolizada por fosfatases lipídicas, com destaque para PTEN (fosfatase e homólogo de tensina), uma proteína codificada pelo gene *PTEN* localizado na posição 10q23.31 do genoma humano. Esta proteína reverte a fosforilação em PIP_3 , encerrando a sinalização de PI3K. No entanto, devido à atividade aumentada de oncogenes, ativação mutacional

de PI3K ou perda da função de PTEN, células cancerígenas apresentam quantidade aumentada de PIP₃ (40,41,44) (**Figura 1**).

Mutações em genes da PI3K ocorrem com frequência em cânceres humano, como alterações em *PIK3CA* em dCCA (6,41). Todas as formas oncogênicas de PI3K têm sua atividade aumentada em comparação à forma não oncogênica (45). Foi observado que a via de PI3K é ativada em câncer pancreático, demonstrando expressão aumentada de p110 α em ACDP em relação às células adjacentes ao tumor (46), assim como expressão reduzida de AKT fosforilada na ocorrência de expressão aumentada de PTEN (44). Além disso, neoplasias malignas pancreáticas apresentam maior número de mutações em *PIK3CA*, em comparação com tumores hepáticos (40). Portanto, é possível esperar padrões distintos de expressão e invasão para o gene *PTEN* em CCA e ACDP.

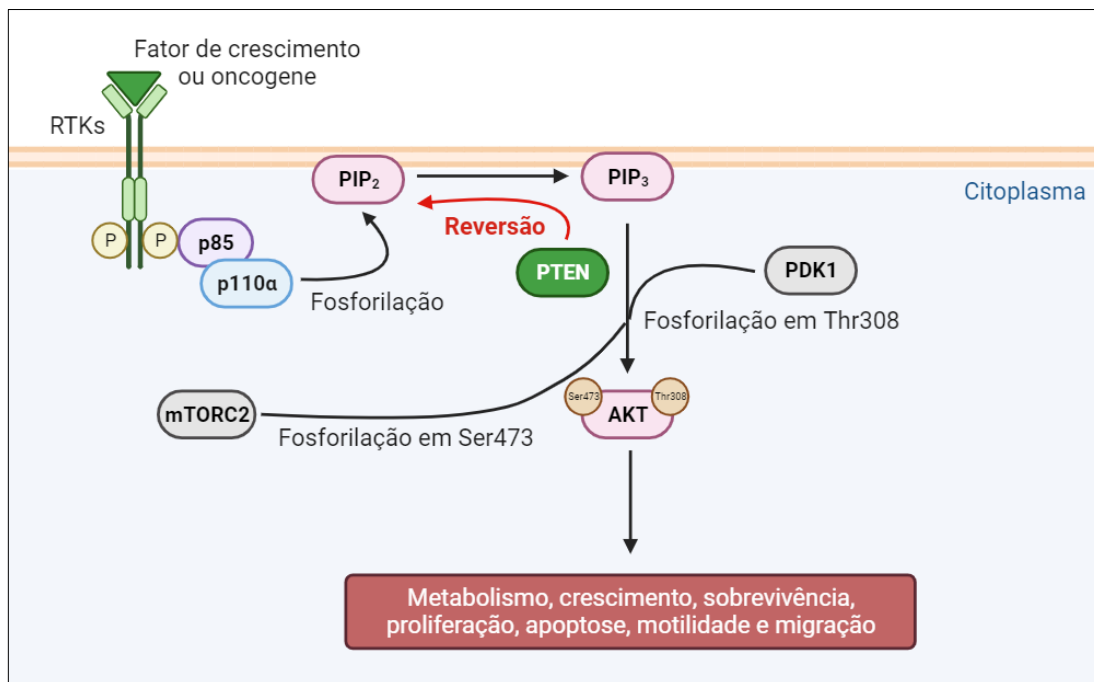


Figura 1. Via PI3K/PTEN de regulação do ciclo celular. Estímulos ativam p110 α (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa), que catalisa a conversão de PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) em PIP₃ (fosfatidilinositol-3-fosfato). PIP₃ ativa AKT (proteína quinase B), afetando funções celulares. A proteína PTEN (fosfatase e homólogo de tensina) regula PIP₃. Feita em Biorender.com.

1.3.2 Via TGF- β /SMAD4 de sinalização e transdução de sinal

A via TGF- β /SMAD4 desempenha um papel fundamental em diversos processos biológicos, como diferenciação celular, apoptose, migração e progressão tumoral, ao mediar a transdução de sinal da membrana celular para o núcleo. Codificada pelo gene *TGFB1* (fator de crescimento transformador beta 1), localizado em 19q13.2 no genoma humano, a proteína citoplasmática TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta 1) atua como supressora tumoral, induzindo a apoptose de células pré-malignas e é secretada por uma variedade de células em todo o organismo. Por outro lado, SMAD4 é uma proteína citoplasmática e nuclear codificada pelo gene *SMAD4*, localizado em 18q21.2 no genoma humano, e pertence a uma família de proteínas responsáveis pela transdução de sinais extracelulares para o núcleo (47,48).

Diante de alta taxa de proliferação celular, a sinalização TGF- β /SMAD4 é ativada, desencadeando efeitos citostáticos e induzindo mecanismos pró-apoptóticos (47). No entanto, ao longo da progressão do câncer, as células tumorais tornam-se insensíveis à TGF- β 1, o que resulta na diminuição da resposta imunológica do organismo contra as células tumorais, favorecendo a angiogênese e a invasão (47,48). Dessa forma, níveis séricos elevados de TGF- β durante o diagnóstico de ACDP podem indicar um prognóstico desfavorável (49).

A principal via de sinalização desse biomarcador (**Figura 2**) inicia-se quando TGF- β 1 se liga ao T β -R (receptor para o fator de crescimento transformador beta) do tipo II, que recruta e fosforila o complexo T β -RI. Este complexo, por sua vez, fosforila SMAD2/3. Em seguida, SMAD2/3 forma um complexo se ligando a SMAD4 e são translocados para o núcleo, onde se ligam ao DNA no elemento de ligação à SMAD

(SBE) e recrutam fatores transcricionais importantes na supressão de tumores (47,48,50,51) (**Figura 2**).

Ainda, nesse contexto, foi evidenciado o envolvimento da via PI3K/AKT/mTOR na regulação da sinalização de TGF- β /SMAD4. A inativação de PI3K/AKT/mTOR impacta a migração celular e a transição epitelial-mesenquimal mediada por TGF- β (48,50,51). Além disso, a superexpressão de AKT suprime a fosforilação de SMAD3 mediada pelo receptor T- β R do tipo II (52).

São reconhecidas deleções de *SMAD4* em vários tipos de câncer, incluindo ACDP, onde foram descritas pela primeira vez, e CCA (20,23,48). A inativação de SMAD4 acarreta modificações na sinalização de TGF- β , o que está associado ao favorecimento da tumorigênese (47). No entanto, a frequência de alterações nesse gene é notavelmente maior em neoplasias malignas pancreáticas em comparação à CCA (20,23,48), o que pode resultar em diferentes padrões de expressões gênica e proteica neste tipo de câncer.

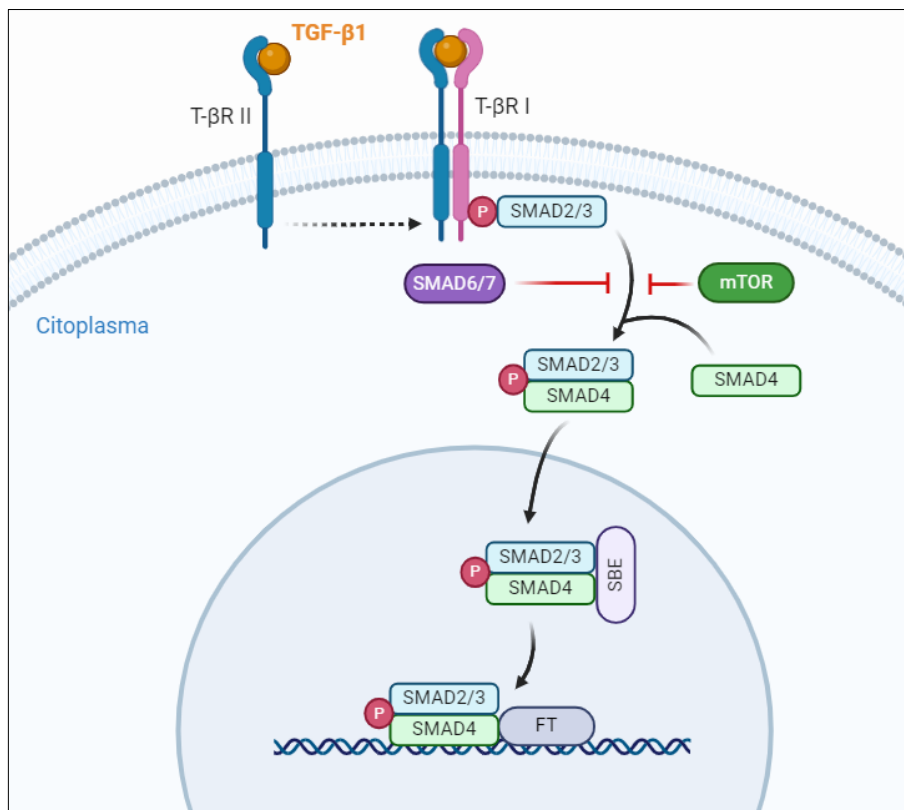


Figura 2. Via TGF-β/SMAD4 de sinalização e transdução de sinal. TGF-β1 (fator de crescimento transformador beta 1) se liga ao receptor Tβ-R (receptor para o fator de crescimento transformador beta) do tipo II. O complexo Tβ-R I fosforila SMAD (*mothers against decapentaplegic homolog*) 2/3, que, em conjunto com SMAD4, transloca-se para o núcleo. Em seguida, ligam-se ao SBE (elemento de ligação à SMAD) para recrutar fatores transcripcionais relacionados à supressão tumoral. Feita em Biorender.com.

1.3.3 Via VEGF-A/HIF-1 α /VEGF-R2 na angiogênese mediada por hipóxia

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Devido ao seu papel importante no transporte de nutrientes aos tecidos, é considerada fundamental na manutenção da homeostase. No entanto, o crescimento desordenado destes vasos pode contribuir com diversos processos patológicos, como câncer e, conseqüentemente, metástases (53,54). Em estágios iniciais da progressão tumoral, os tumores são pequenos e avasculares. Contudo, em razão do aumento da demanda metabólica, ocorre o desenvolvimento de uma vascularização tumoral exclusiva, desencadeada por fatores de crescimento liberados pelas células cancerígenas e outras células no microambiente tumoral (55).

Nesse contexto, membro da família VEGF, o VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A) é uma glicoproteína codificada pelo gene *VEGFA*, localizado no cromossomo 6p21.1 humano, que desempenha papel central na regulação de processos moleculares da angiogênese em contextos fisiológicos e patológicos (53,54). Além disso, expresso predominantemente em células endoteliais, VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular), codificado pelo gene *KDR* (receptor do domínio de inserção da quinase), localizado em 4q12 no genoma humano, é o principal receptor para VEGF-A. A sua ativação promove mitose e permeabilidade de células endoteliais, assim como proliferação, migração, invasão a tecidos circundantes e sobrevivência celular durante a angiogênese (53,54).

Por meio da via de sinalização *notch*, ocorre aumento da expressão de DLL4 (*delta-like 4*), entre outros ligantes, o que induz as células endoteliais *tip cells* (células de ponta) a formarem filopódios em resposta ao VEGF. Então, o aumento da sinalização *notch* reduz a expressão de VEGF-R2, desencadeando assim um mecanismo de *feedback*

negativo (53) (**Figura 3**). Apesar de não ser notadamente vascularizado, ACDP secreta VEGF-A, além de expressar VEGF-R2 em linhagens celulares. Esses biomarcadores desempenham papéis importantes no desenvolvimento tumoral, visto que altos níveis de VEGF-A e VEGF-R2 estão correlacionados com recidiva e mau prognóstico em ACDP (56).

Ressalta-se que o crescimento tumoral está intimamente relacionado à estimulação da angiogênese. Nesse contexto, é bem estabelecido que a microvasculatura tumoral apresenta diferenças estruturais e funcionais, como aumento de vazamento, formato tortuoso e outras características aberrantes (54,55). Além disso, embora seja produzido em diversas células, o contexto de hipóxia devido ao crescimento tumoral é o principal regulador de sua expressão, mediada por fatores induzíveis por hipóxia (HIF) (53,54). Desse modo, a disfunção da vasculatura estimulada por VEGF reduz a eficiência do fluxo sanguíneo tumoral acarretando hipóxia e consequente aumento na produção de VEGF (55).

Uma das características mais marcantes do microambiente tumoral é a hipóxia. Dentre os fatores induzíveis por hipóxia, ressaltasse HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 alfa), o principal regulador deste estado, essencial para a expressão gênica em célula hipóxicas e codificado pelo gene *HIF1A* (fator induzível por hipóxia 1, subunidade alfa). Em condições normais de oxigênio, HIF-1 α é degradado pelo sistema proteassomo. No entanto, em condições de hipóxia, fatores importantes para sua degradação são regulados negativamente, resultando em estabilização e translocação para o núcleo. O HIF-1 α , no núcleo, desempenha funções essenciais na transcrição de diversos genes, incluindo o *VEGF-A* e *TGFB* (57).

Não obstante, AKT, um intermediário na via de PI3K, desempenha papel fundamental na biologia regulada por VEGF das células endoteliais, por meio da sobrevivência, proliferação e permeabilidade. Além disso, PI3K pode ser ativado por VEGF-A por meio da ligação direta de PI3K em Y1175 (resíduo de tirosina na posição 1175) de VEGF-R2. Em consequência desta ativação, a AKT exerce um papel fundamental na regulação das células endoteliais, afetando sua sobrevivência, proliferação e liberação de metaloproteinases (MMPs) (54).

Níveis adequados de VEGF-A e HIF-1 α são importantes para o desenvolvimento pancreático normal. Contudo, altas expressões de HIF-1 α inibem a diferenciação de células progenitoras endócrinas pancreáticas, ao mesmo tempo em que regulam positivamente e negativamente diversos genes relacionados à viabilidade celular, proliferação, migração, angiogênese, invasão, crescimento tumoral e resistência à quimioterapia (58).

Além disso, VEGF está superexpresso na maioria dos tipos de câncer humano e tem associação com invasão e metástase (53,58). Por outro lado, alta expressão de HIF-1 α é encontrada em CCA (59), especialmente, em seu subtipo intra-hepático, em comparação ao tecido saudável (60). O subtipo extra-hepático pode apresentar marcação principalmente na borda invasiva do tumor (61). Entretanto, ACDP pode exibir padrões de marcação heterogêneos para HIF-1 α (62).

Estudos sobre as expressões comparativas de VEGF-A, HIF-1 α e VEGF-R2 em ACDP e CCA, considerando seus subtipos, assim como a associação com características anatomopatológicas, são escassos. No entanto, esta investigação comparativa pode contribuir significativamente para o entendimento dos mecanismos subjacentes à hipóxia

e angiogênese destes tumores. Além disso, pode auxiliar na identificação de biomarcadores específicos que caracterizem estas doenças.

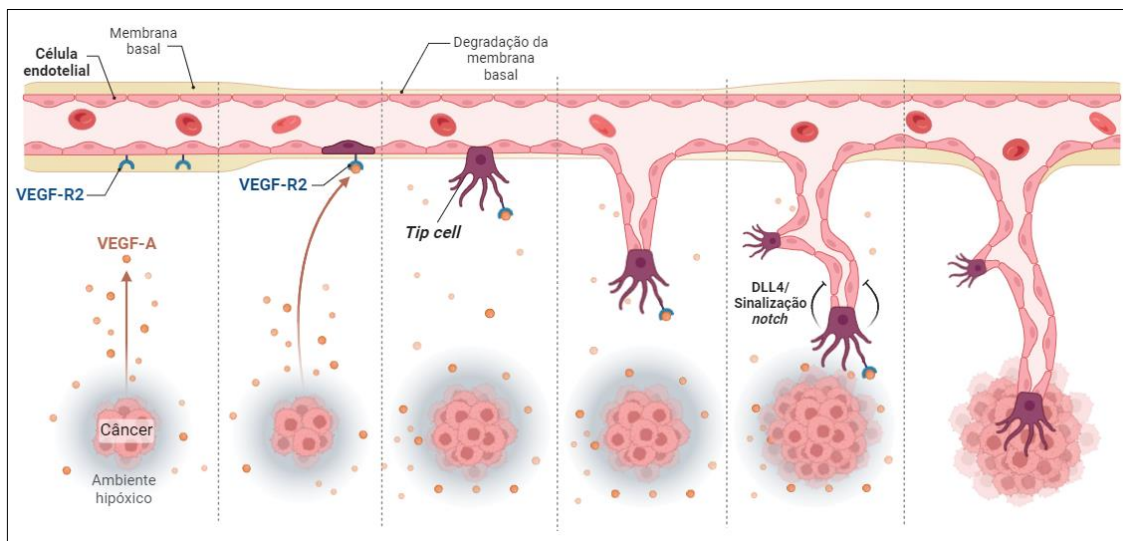


Figura 3. Mecanismos de regulação da angiogênese tumoral. A ativação do VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) promove a mitose e permeabilidade das células endoteliais, enquanto a sinalização *notch* induz as células de ponta a formarem filopódios em resposta ao VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A). O aumento da sinalização *notch* resulta na redução da expressão de VEGF-R2, estabelecendo um *feedback* negativo regulatório. Adaptada de Biorender.com (63).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar comparativamente a expressão gênica e proteica de biomarcadores envolvidos em vias da carcinogênese em CCA e ACDP, e sua associação com características anatomopatológicas, visando identificar marcadores de classificação e diagnóstico diferencial destas doenças.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar comparativamente a expressão gênica de *PIK3CA*, *PTEN*, *SMAD4* e *TGFB1*, *VEGFA*, *HIF1A* e *KDR* em tecido tumoral de pacientes com eCCA, iCCA e ACDP.
2. Analisar comparativamente a expressão proteica e respectiva localização subcelular de p110 α , PTEN, SMAD4 e TGF- β 1, VEGF-A, HIF-1 α e VEGFR-2 em tecido tumoral de pacientes com eCCA, iCCA e ACDP.
3. Verificar a associação da expressão gênica e proteica dos referidos biomarcadores com características anatomopatológicas do tecido tumoral de eCCA, iCCA e ACDP.
4. Avaliar a capacidade classificatória da expressão gênica e proteica em tecido tumoral dos referidos biomarcadores na discriminação entre eCCA, iCCA e ACDP.

Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (CAAE: 56674322.1.0000.5415) e da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (CAAE: 67005822.8.0000.5404); conduzido em conformidade com a Declaração de Helsinque.

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo retrospectivo. Os grupos de pacientes e controles foram constituídos mediante critérios rigorosos de seleção, considerando o diagnóstico padrão-ouro por imuno-histoquímica (IHQ). Neste sentido, foram coletadas 30 amostras de tecido de CCA fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE), sendo 17 eCCA e 13 iCCA, além de 22 amostras de tecido FFPE de ACDP, armazenadas nos Setores de Patologia do Hospital de Base (HB) da FAMERP e da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, no período de 2004 a 2023. As neoplasias malignas ainda não haviam invadido os demais órgãos do sistema biliopancreático, dificultando o diagnóstico de origem primária destas doenças. O diagnóstico de CCA e ACDP foi realizado de acordo com as diretrizes de prática do *College of American Pathologists*, baseado na classificação de tumores da Organização Mundial da Saúde (*WHO Classification of Tumours*). A confirmação da não invasão aos demais órgãos foi realizada utilizando exames de imagem (tomografia computadorizada, ressonância magnética e colangioressonância), bem como, por meio dos laudos anatomopatológicos dos pacientes.

Os respectivos grupos controles foram constituídos por sete amostras de tecido de ducto biliar não neoplásico (DBNN) fresco e FFPE de indivíduos diagnosticados com colelitíase submetidos à cirurgia eletiva de colecistectomia por videolaparoscopia no

Setor de Cirurgia Geral do HB/FAMERP, no período de 2019 a 2021, sem sinais clínicos, bioquímicos e histopatológicos de CCA e/ou ACDP, e 8 amostras FFPE de ducto pancreático não neoplásico (DPNN) de indivíduos submetidos à necrópsia, no Serviço de Verificação de Óbitos do HB/FAMERP, em 2023, sem sinais clínicos, bioquímicos e histopatológicos de CCA e/ou ACDP.

Optou-se por amostras de tecido fresco de ducto biliar coletadas durante cirurgia eletiva de colecistectomia por videolaparoscopia como grupo controle de CCA, tendo em vista a dificuldade em obter amostras de ductos biliares não neoplásicos para controle, uma vez que os pacientes encaminhados para necrópsia nem sempre apresentam vesícula biliar e ductos biliares disponíveis e viáveis para coleta.

Foi realizado o corte das amostras dos referidos tecidos em micrótomo rotativo manual (Leica BiosystemsTM, Wetzlar, Alemanha), seguido de confecção de lâminas histológicas e identificação das regiões tumorais por duas médicas patologistas. As lâminas com as amostras de tecido ductal biliar e pancreático não neoplásicos foram demarcadas considerando as regiões contendo ductos não neoplásicos.

Os dados do perfil demográfico (sexo e idade) e anatomopatológico (grau do tumor, invasões, metástase – em linfonodo – e estadiamento) foram obtidos por meio de prontuários informatizados ou laudos anatomopatológicos.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de RNA Total e RT-qPCR

O RNA total das amostras de tecido emblocado de CCA, ACDP, e DPNN foi extraído utilizando o kit ReliaPrepTM FFPE Total RNA Miniprep System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) de acordo com o manual do fabricante. O RNA total das

amostras de tecido fresco de DBNN foi extraído utilizando TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com o manual do fabricante.

Em seguida, a concentração e pureza do RNA total foram quantificadas utilizando o equipamento NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), segundo o manual do fabricante. Foi realizada diluição do RNA total e síntese de cDNA (DNA complementar) por meio do kit High-Capacity cDNA® (Applied Biosystems™, Waltham, Massachusetts, EUA) utilizando o termociclador Esco Technologies – Swift™ Maxi Thermal Cyclers, em concentração final de 5 ng/μl. Por fim, foi realizada a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando 10 μl TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 8 μl de UltraPure™ DEPC-Treated Water (Invitrogen™), 1 μl de TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems™) e 1 μl de cDNA, por meio do equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). As amostras foram processadas a 50 °C por dois minutos, 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto, de acordo com o protocolo do fabricante.

Foram utilizadas as seguintes sondas de hidrólise TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems™): *PIK3CA*: Hs00907954_m1, *PTEN*: Hs02621230_s1, *SMAD4*: Hs00929647_m1, *TGFGB1*: Hs00998133_m1, *VEGF-A*: Hs00900055_m1, *HIF1A*: Hs00153153_m1 e *KDR*: Hs00911700_m1. Foram utilizados os genes reguladores *ACTB* (actina beta) (Hs01060665_g1) e *RPLP0* (subunidade P0 da proteína ribossômica do pedúnculo lateral) (Hs99999902_m1). A expressão gênica foi calculada por meio do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (64), transformada em $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$ e apresentada como mudança de dobra (*fold-change*, FC).

3.2.2 Imuno-histoquímica, Análise de Imagens e Expressão Proteica

As expressões proteicas foram analisadas por meio da técnica de IHQ. As amostras FFPE foram cortadas em lâminas silanizadas, na espessura de 3 µm em micrótomo rotativo manual (Leica Biosystems™). Em seguida, as lâminas foram submetidas à estufa a 60 °C durante 12 horas para fixação das amostras.

Inicialmente, foi realizada desparafinação das amostras em banhos de xilol e álcool. A seguir, foi realizada recuperação antigênica com as lâminas submersas em solução tampão, de acordo com o **Quadro 1**, seguido de descanso em temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. Após recuperação antigênica, foram realizadas duas lavagens de cinco minutos com tampão PBS (tampão fosfato-salino) (pH 7,4). Em seguida, foi realizado bloqueio das peroxidases com duas lavagens de 20 minutos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10% em metanol, em câmara escura. Então, foram realizadas duas lavagens de cinco minutos com tampão PBS (pH 7,4). Após, foi realizado o bloqueio das proteínas inespecíficas de acordo com o **Quadro 1**.

Em seguida, foi realizada incubação dos anticorpos-primários PIK3CA Monoclonal Antibody (H.843.0, Invitrogen™), (diluição 1:100), PTEN Monoclonal Antibody (17.A, Invitrogen™) (diluição 1:100), SMAD4 Monoclonal Antibody (4089-MSM1-P1, NeoBiotechnologies) (diluição 1:50), TGF-β1 Monoclonal Antibody (TB21, Invitrogen™) (diluição 1:100), VEGF-A Polyclonal Antibody (STJ96473, St. John's Laboratory) (diluição 1:100), HIF-1α Monoclonal Antibody (H1alpha67, Invitrogen™) (diluição 1:50) e VEGF-R2 Monoclonal Antibody (CD309, AbboMax) (diluição 1:100) por *overnight* em geladeira. Todos diluídos em solução PBS + BSA (albumina sérica bovina) a 1%.

Após incubação dos anticorpos primários e três lavagens de cinco minutos com tampão PBS (pH 7,4), foram incubados os anticorpos secundários Novocastra™ Post Primary ou Abcam® Reveal HRP Conjugate, a depender do *host* do anticorpo primário, por 1 hora. Em seguida, foram realizadas três lavagens de cinco minutos com tampão PBS (pH 7,4). Na etapa seguinte, foi realizada incubação do polímero Novolink™ Polymer por 1 hora. Então, foi realizada revelação com DAB (3,3'-diaminobenzidina) Novocastra™ DAB Chromogen, na diluição 1:20 em substrato Novolink™ DAB Substrate Buffer, de acordo com o **Quadro 1**. O tempo de revelação foi padronizado de acordo com tecido controle positivo para cada biomarcador (**Figura 4**), escolhido sob consulta ao *The Human Protein Atlas* (65). Por fim, foi realizada a contra coloração com hematoxilina durante um minuto, seguido de lavagem com água destilada para a retirada de hematoxilina residual, passagem em bateria de álcoois e xilóis e montagem das lâminas com lamínulas e meio de montagem Entellan™ (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As lâminas foram escaneadas em aumento de 40X por meio do escâner Olympus BX61VS Research Slide Scanner (Olympus Corporation, Shinjuku, Tóquio, Japão), com câmera ALLIED Vision Pike F505C VC50 (Allied Vision Technologies, Stadtroda, Thuringia, Alemanha) acoplada, adaptadores U-TV0.5XC-3 (Olympus Corporation) e U-TLU (Olympus Corporation) e Control Box BX-UCB (Olympus Corporation).

Em seguida, as imagens foram recortadas em 150 µm por 200 µm, em quintuplicata, de modo a representar toda a extensão da lâmina, por meio do software OLYMPUS OlyVIA (versão 3.4.1). Os cortes foram avaliados por um médico patologista, visando confirmar a captura de células neoplásicas na imagem. O processamento e análise dos cortes foram realizados com o software, de domínio público, ImageJ 1.53t (versão 64-bit) (66).

A contagem de pixels, porcentagem de marcações muito positivas, positivas, pouco positivas, negativas, assim como a classificação da marcação foram analisadas por meio do plugin de acesso aberto IHC Profiler (67), compatível com ImageJ, conforme o tipo de marcação, podendo ser citoplasmática ou nuclear. Em caso de marcações citoplasmáticas, o plugin realizou uma deconvolução da imagem e disponibilizou um histograma da quantidade e valor dos pixels, assim como, a porcentagem de marcações muito positivas, positivas, pouco positivas, negativas e a classificação da marcação. Por outro lado, em caso de marcação nuclear, o plugin realizou a deconvolução da imagem juntamente de um ajuste automático de limiar (*threshold*), que foi mantido nas configurações originais, visando padronização dos resultados.

A expressão proteica foi quantificada pelo método HistoScore (68), em que os valores semiquantitativos da IHQ clássica foram convertidos em valores quantitativos, baseado na intensidade da coloração e na porcentagem de células coradas informados pelo plugin IHC Profiler, podendo variar de 0 a 300. Nesse caso, é dividido em quatro categorias de imuno-histoquímica relatadas em células percentuais: células coradas negativas (0), fracas (1+), moderadas (2+) e fortemente (3+), que são equivalentes a porcentagem de marcações negativas, pouco positivas, positivas e muito positivas informadas pelo plugin IHC Profiler. Para cada imagem obtida dos casos, um HistoScore foi calculado da seguinte forma:

$$HistoScore = 0 \times \% \text{ células negativamente coradas} + (1 \times \% \text{ células fracamente coradas}) + (2 \times \% \text{ células moderadamente coradas}) + (3 \times \% \text{ células fortemente coradas}).$$

Os valores de HistoScore de cada uma das três imagens obtidas de um caso foram utilizados para mensurar o valor médio da expressão proteica da amostra do paciente.

Quadro 1. Tampões, temperaturas e tempos utilizados nas etapas de recuperação antigênica, bloqueio de proteínas inespecíficas, revelação com DAB (3,3'-diaminobenzidina) e contra coloração com hematoxilina para cada proteína analisada por meio de imuno-histoquímica.

Proteína	Recuperação Antigênica	Bloqueio Proteínas Inespecíficas	Revelação com DAB	Contra coloração com hematoxilina
p110 α	Citrato (pH 6,0) 95 °C por 1h	PBS + Leite desnatado 30min	5min	40seg
PTEN	Citrato (pH 6,0) 95 °C por 1h	PBS + Leite desnatado 30min	10min	40seg
SMAD4	Tris-EDTA (pH 9,0) 98 °C por 1h30	PBS + BSA 1% 1h	5min	1min
TGF- β 1	Tris-EDTA (pH 9,0) 98 °C por 1h30	PBS + Leite desnatado 45min	1min	1min
VEGF-A	Citrato (pH 6,0) 95 °C por 1h	PBS + Leite desnatado 30min	10min	40seg
HIF-1 α	Citrato (pH 6,0) 98 °C por 1h30	PBS + BSA 1% 45min	5min	2min
VEGF-R2	Citrato (pH 6,0) 98 °C por 1h	PBS + BSA 5% 30min	5min	2min

p110 α =fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa. PTEN= fosfatase e homólogo de tensina. TGF- β 1=fator de crescimento transformador beta 1. SMAD4=*mothers against decapentaplegic homolog*. VEGF-A=fator de crescimento endotelial vascular A. HIF-1 α =fator induzível por hipóxia 1 alfa. VEGF-R2=receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular.

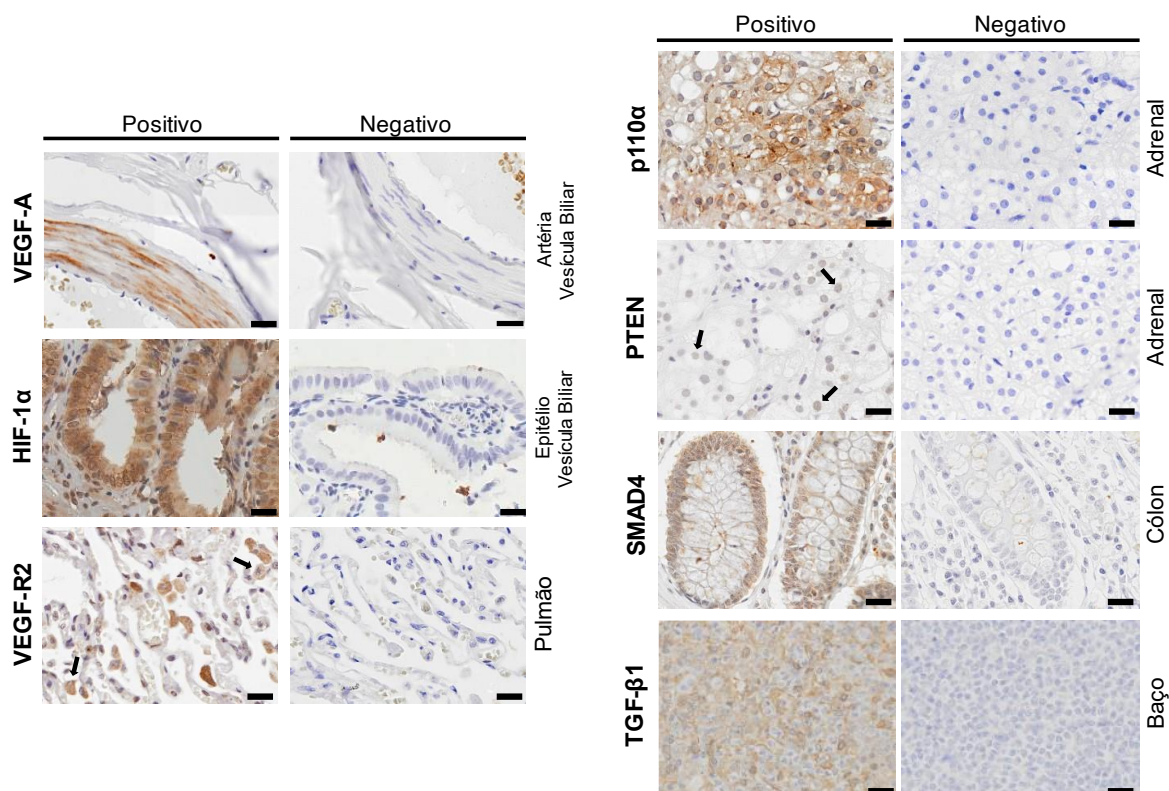


Figura 4. Marcações imuno-histoquímicas de tecidos controle positivos para VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A), HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 alfa), VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular), p110 α (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa), PTEN (fosfatase e homólogo de tensina), SMAD4 (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e TGF- β 1 (fator de crescimento transformador beta 1). As barras de tamanho representam 20 μ m.

3.2.3 Análises estatísticas

Os dados foram analisados quanto à normalidade de seus resíduos por meio do teste de Shapiro-Wilk (69). A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Levene (70). Os resultados de variáveis contínuas com distribuição normal foram reportados como média (M) $\pm$ erro padrão (EP). Por outro lado, os resultados de variáveis contínuas sem distribuição normal foram reportados como mediana (Mdn), mínimo e máximo.

Para comparação da expressão gênica com controle relativo, foi utilizado teste t de uma amostra. Na comparação entre dois grupos, utilizou-se teste de Mann-Whitney. Em comparações entre três grupos foi utilizado Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Bonferroni ou teste de Kruskal-Wallis, com post-hoc de Dunn para múltiplas comparações e ajuste de Benjamini-Hochberg para os valores de P (71). Para a análise de variáveis categóricas, foi aplicado o teste exato de Fisher e resíduos padronizados ajustados ($>|2,0|$) para comparação entre grupos. Nas análises de correlação, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Foi realizada regressão logística binária para predição de características anatomopatológicas por meio das expressões dos biomarcadores (72).

Quando à análise do potencial discriminatório para classificação das neoplasias malignas por meio da expressão gênica e proteica, foi utilizada curva ROC (Característica de Operação do Receptor). Os resultados foram descritos como ponto de corte (*cutoff*), área sob a curva (AUC), sensibilidade, especificidade e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) pelo teste de DeLong (73).

As análises estatísticas foram realizadas, utilizando a linguagem de programação R (74,75), bem como, diversas funções auxiliares (76–79). Os gráficos foram

confeccionados utilizando ggplot2 (80) e ggpubr (81). Admitiu-se significância para valores de $P < 0,05$. Além disso, neste estudo, o tamanho amostral reduzido, embora uma limitação, não impediu a análise estatística dos dados.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Perfil Demográfico e Anatomopatológico

Neste estudo, foram analisadas 22 amostras de tecido tumoral de pacientes com ACDP (42,3%), 17 com eCCA (32,7%) e 13 com iCCA (25%), o que indicou proporções semelhantes para os três grupos ($P=0,309$).

Observamos semelhança para sexo em todos os grupos ($P=0,732$). Houve semelhança na idade de ACDP (Mdn= 60 anos) comparado com eCCA (Mdn = 58,5, anos; $P=0,422$) e iCCA (Mdn = 60; $P=0,434$), assim como entre eCCA e iCCA ($P=0,413$). Por outro lado, na comparação entre pacientes e controles, ACDP e DPNN (Mdn = 56 anos) apresentaram faixa etária semelhante ($P=0,393$). No entanto, pacientes com eCCA (Mdn=58,5 anos) e iCCA (Mdn=60 anos), mostraram idade aumentada em comparação a DBNN (Mdn=33 anos; $P=0,033$ e $P=0,019$, respectivamente) (**Tabela 1**).

Houve maior frequência dos estágios I ou II em amostras de ACDP (70%), enquanto para iCCA e eCCA prevaleceram os estágios III ou IV (85,7% e 83,3%, respectivamente) ($P=0,012$; **Tabela 2**). Quanto à diferenciação celular, observou-se semelhança na frequência de tumor bem, moderadamente e pouco diferenciado em todos os grupos ($P=0,929$), assim como, presença e ausência de invasão vascular ($P=0,213$), perineural ($P=0,201$) e metástase ($P=0,859$; **Tabela 2**). Por outro lado, para ACDP destacou-se presença de invasão linfática (81,8%), enquanto para eCCA predominou ausência de invasão (63,6%) ($P=0,019$; **Tabela 2**). Para iCCA, observamos semelhança nas frequências de presença e ausência deste tipo de invasão, em decorrência dos resíduos ajustados padronizados (1,217).

Tabela 1. Perfil demográfico de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) e colangiocarcinoma dos subtipos extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA), ducto pancreático não neoplásico (DPNN) e ducto biliar não neoplásico (DBNN).

Característica	ACDP ^a (n=22)	eCCA ^b (n=17)	iCCA ^c (n=13)	DPNN ^d (n=08)	DBNN ^e (n=07)	P					
						axb	axc	bxc	axd	bxe	cxe
Sexo, % (n)											
Masculino	59,1 (13)	47,1 (08)	53,8 (07)	50 (04)	71,4 (05)				0,732		
Feminino	40,9 (09)	52,9 (09)	46,2 (06)	50 (04)	28,6 (02)						
Idade em anos											
Mediana (n)	60 (22)	58,5 (14)	60 (13)	56 (08)	33 (07)						
Mínimo-Máximo	44-78	41-79	45-74	04-69	29-65	0,422	0,434	0,413	0,393	0,033	0,019

Tabela 2. Características anatomopatológicas de pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) e colangiocarcinoma dos subtipos extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA).

Característica	ACDP (n=22)	eCCA (n=17)	iCCA (n=13)	P
Estadiamento				
I ou II	70 (14)	16,7 (01)	14,3 (01)	0,012
III ou IV	30 (06)	83,3 (05)	85,7 (06)	
Diferenciação Celular, % (n)				
Bem diferenciado	27,3 (06)	25 (03)	25 (02)	0,929
Moderadamente diferenciado	59,1 (13)	50 (06)	50 (04)	
Pouco diferenciado	13,6 (03)	25 (03)	25 (02)	
Invasão Vascular, % (n)				
Presente	77,3 (17)	44,4 (04)	77,8 (07)	0,213
Ausente	22,7 (05)	55,6 (05)	22,2 (02)	
Invasão linfática, % (n)				
Presente	81,8 (18)	36,4 (04)	44,4 (04)	0,019
Ausente	18,2 (04)	63,6 (07)	55,6 (05)	
Invasão Perineural, % (n)				
Presente	77,3 (17)	62,5 (05)	44,4 (04)	0,201
Ausente	22,7 (05)	37,5 (03)	55,6 (05)	
Metástase, % (n)				
Presente	61,9 (13)	64,3 (09)	54,5 (06)	0,859
Ausente	38,1 (08)	35,7 (05)	45,5 (05)	

4.2 Expressão Gênica e Proteica de p110 α (*PIK3CA*) e PTEN (*PTEN*)

Houve superexpressão de *PIK3CA* em ACDP (M=3,6 $\pm$ 0,63; n=21), eCCA (M=3,14 $\pm$ 0,55) e iCCA (M=3,57 $\pm$ 0,85), na comparação com controle relativo (P<0,01, para todos). O mesmo ocorreu para *PTEN* com superexpressão em ACDP (M=2,5 $\pm$ 0,52; P<0,001), eCCA (M=1,54 $\pm$ 0,57; P=0,02) e iCCA (M=2,72 $\pm$ 0,93; P=0,013). Além disso, na comparação entre os três grupos, observamos semelhança na expressão de *PIK3CA* (P=0,862), assim como de *PTEN* (P=0,416) (**Figura 5A**).

A análise por IHQ (**Figura 5B**) mostrou marcação citoplasmática de p110 α em 13/20 (65%) casos de ACDP, co-expressão citoplasmática e difusa em 01/20 (5%), apenas difusa em 02/20 (10%) e negativa em 04/20 (20%). Para eCCA, predominou a marcação citoplasmática de p110 α (07/09; 77,8%), assim como, em iCCA (06/07; 85,7%), enquanto os casos negativos representaram 22,2% (02/09) e 14,3% (01/07), respectivamente. Em relação aos controles, DPNN apresentou marcação negativa de forma predominante (02/03; 66,7%), assim como DBNN (03/03; 100%), enquanto co-expressão citoplasmática e nuclear ocorreu em apenas um caso (1/03; 33,3%) de DPNN.

Quanto à marcação proteica de PTEN (**Figura 5B**), a co-expressão citoplasmática e nuclear predominou em ACDP (07/17; 41,2%), assim como, em iCCA (04/06; 66,7%) e DBNN (02/03; 66,7%). Por outro lado, marcação negativa destacou-se em eCCA (04/09; 44,4%) e DPNN (03/03; 100%), mas foi observada também em ACDP (05/07; 29,4%) e DBNN (01/03; 33,3%). A marcação apenas citoplasmática representou 33,3% (02/06) dos casos de iCCA, 22,2% (02/09) de eCCA e 23,5% (04/17) em ACDP. A marcação nuclear foi observada apenas em ACDP (01/17; 5,9%).

Adicionalmente, foi observada expressão proteica de p110 α (**Figura 5C**), semelhante para ACDP (Mdn=1,54; n=19), eCCA (Mdn=1,36; n=09), iCCA (Mdn=3,12;

n=07), DPNN (Mdn=0,17; n=03) e DBNN (Mdn=0,08; n=03) (Kruskal-Wallis, P=0,09).

Da mesma forma, encontramos semelhança na expressão proteica de PTEN em ACDP (Mdn=4,86; n=17), eCCA (Mdn=2,31; n=09), iCCA (Mdn=5,97; n=06), DPNN (Mdn=7,81; n=03) e DBNN (Mdn=4,35; n=03) (Kruskal-Wallis, P=0,82).

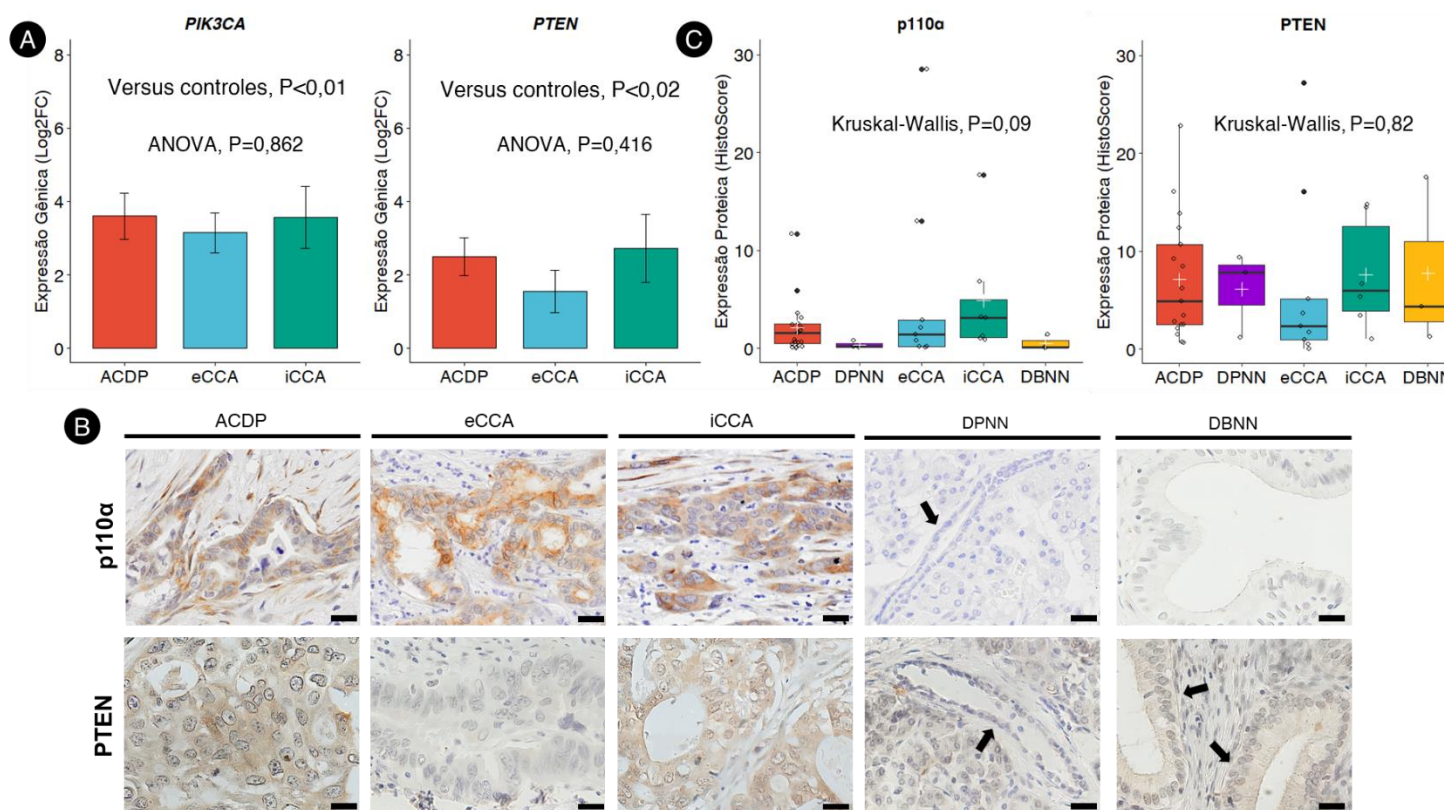


Figura 5. (A) Comparação da expressão gênica de *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina) em adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), subtipos de colangiocarcinoma extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA). Barras representam média e erro padrão. (B) Padrão mais frequente de marcação na análise imuno-histoquímica de *p110α* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e *PTEN* em ACDP, eCCA, iCCA, ducto pancreático não neoplásico (DPNN) e ducto biliar não neoplásico (DBNN). As barras de tamanho representam 20 μ m. (C) Comparação da expressão proteica de *p110α* e *PTEN* em ACDP, eCCA, iCCA, DPNN e DBNN. A cruz branca representa média.

4.3 Expressão Gênica e Proteica de TGF- β 1 (*TGFB1*) e SMAD4 (*SMAD4*)

Houve superexpressão de *SMAD4* (**Figura 6A**) em ACDP ($M=2,9\pm0,62$; $n=20$), eCCA ($M=2,74\pm0,71$; $n=17$) e iCCA ($M=4,28\pm0,66$; $n=13$), na comparação com o controle relativo ($P<0,01$, para todos). Da mesma forma, foi observada superexpressão de *TGFB1* em ACDP ($M=3,22\pm0,68$; $n=18$), eCCA ($M=4,53\pm0,53$; $n=16$) e iCCA ($M=7,83\pm0,69$; $n=13$), comparado ao controle relativo ($P<0,01$, para todos). A comparação entre os pacientes mostrou semelhança na expressão de *SMAD4* nos três grupos (ANOVA, $P=0,258$). No entanto, houve expressão acentuada de *TGFB1* em iCCA, comparado com ACDP ($P<0,0001$), e com eCCA ($P<0,001$) (ANOVA, $P<0,0001$).

Em relação à análise proteica por IHQ (**Figura 6B**) prevaleceu marcação negativa para SMAD4 em ACDP (10/18; 55,6%), iCCA (03/06; 50%), DPNN e DBNN (02/03; 66,7%, para ambos), mas apenas 10% (1/10) dos casos de eCCA. Em eCCA destacou-se a marcação citoplasmática (08/10; 80%), também observada em ACDP (06/18; 33,3%), DPNN (01/03; 33,3%) e iCCA (01/06; 16,7%). A co-expressão citoplasmática e nuclear foi observada principalmente em iCCA (02/06; 33,3%) e DBNN (01/03; 33,3%), assim como, em eCCA (01/10; 10%) e ACDP (01/18; 5,6%).

Quanto à análise proteica por IHQ de TGF- β 1 (**Figura 6B**), destacou-se a forma negativa de marcação principalmente em DBNN (03/03; 100%), assim como, em DPNN (02/03; 66,7%) iCCA (04/07; 57,1%) e eCCA (04/10; 40%) que mostrou frequência semelhante para marcação citoplasmática (04/10; 40%), também observada em outros grupos. Nesse caso, destacou-se ACDP, com marcação citoplasmática em 57,9% (11/19) dos casos, além de DPNN (01/03; 33,3%) e iCCA (02/07; 28,6%). A co-expressão citoplasmática e nuclear foi observada em ACDP (04/19; 21,1%) e iCCA (01/07; 14,3%), enquanto a marcação nuclear apenas em eCCA (02/10; 20%).

Adicionalmente, observou-se expressão proteica de SMAD4 (**Figura 6C**) semelhante para ACDP (Mdn=0,68; n=18), eCCA (Mdn=2,16; n=10), iCCA (Mdn=0,52; n=06), DPNN (Mdn=0,48; n=03) e DBNN (Mdn=1,41; n=03) (Kruskal-Wallis, $P=0,14$). Em contrapartida, houve aumento de expressão proteica de TGF- β 1 ($P=0,04$. Kruskal-Wallis), particularmente, em ACDP (Mdn=15,8; n=19) e DPNN (Mdn=4,26; n=03), comparado a eCCA (Mdn=0,59; n=10), iCCA (Mdn=0,45; n=07) e DBNN (Mdn=0,25; n=03), no entanto, as comparações par-a-par reportaram semelhança entre os grupos ($P>0,05$, para todos) (**Figura 6C**).

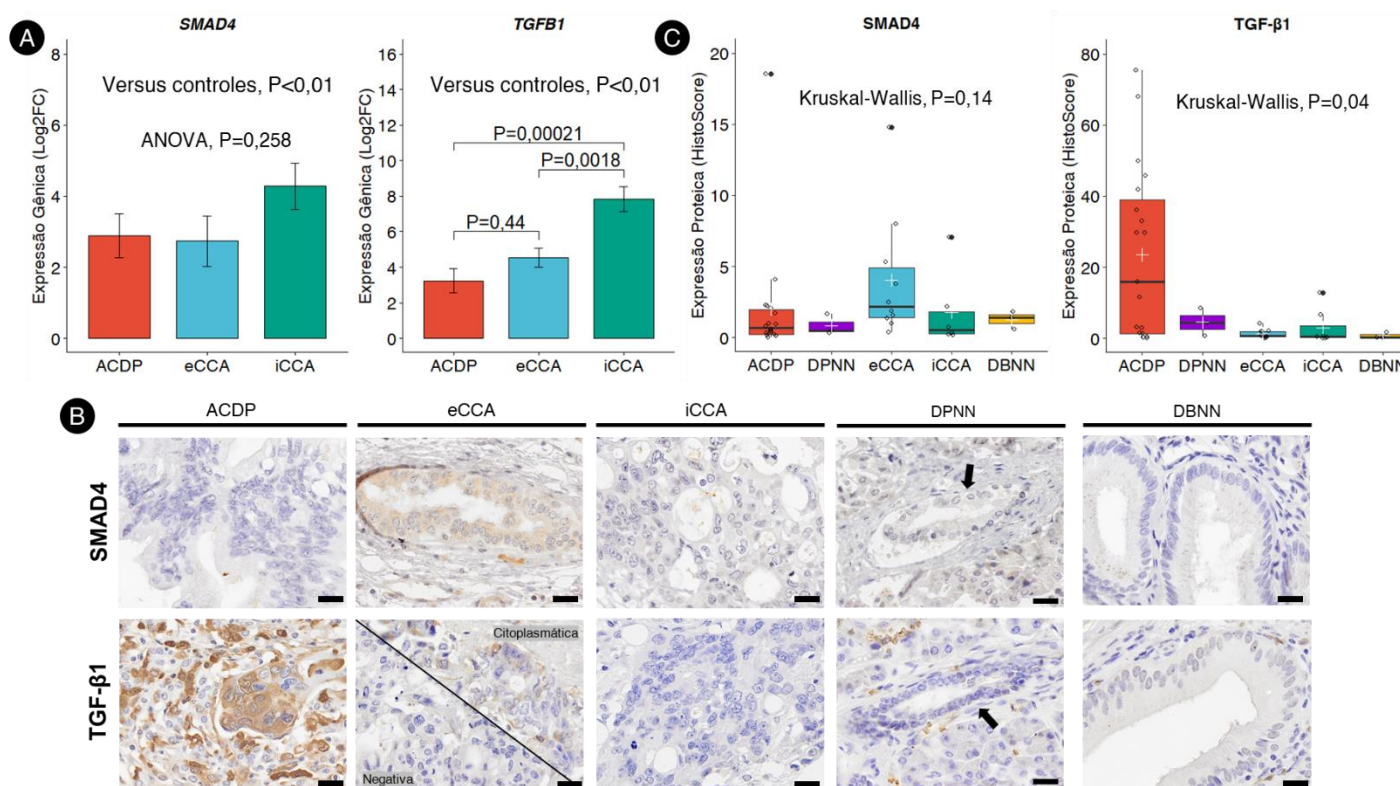


Figura 6. (A) Comparação da expressão gênica de *SMAD4* (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e *TGF-β1* (fator de crescimento transformador beta 1) em adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), subtipos de colangiocarcinoma extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA). Barras representam média e erro padrão. (B) Padrão mais frequente de marcação na análise imuno-histoquímica de SMAD4 e TGF-β1 (fator de crescimento transformador beta 1) em ACDP, eCCA, iCCA, ducto pancreático não neoplásico (DPNN) e ducto biliar não neoplásico (DBNN). As barras de tamanho representam 20 μ m. (C) Comparação da expressão proteica de SMAD4 e TGF-β1 em ACDP, eCCA, iCCA, DPNN e DBNN. A cruz branca representa média.

4.4 Expressão Gênica e Proteica de VEGF-A (*VEGFA*), HIF-1 α (*HIF1A*) e VEGF-R2 (*KDR*)

A análise da expressão gênica mostrou superexpressão de *VEGFA* e *KDR* em tecido tumoral dos três grupos de pacientes, comparado aos respectivos controles relativos ($P < 0,01$, para todos) (**Figura 7A**). Nesse caso, para *VEGFA* em ACDP ($M = 1,43 \pm 0,5$; $n = 21$), eCCA ($M = 1,9 \pm 0,51$; $n = 17$) e iCCA ($M = 3,73 \pm 0,82$; $n = 13$) e *KDR*, respectivamente, (ACDP: $M = 2,44 \pm 0,5$; $n = 19$; eCCA: $M = 3,7 \pm 0,72$; $n = 14$; iCCA: $M = 5,4 \pm 0,64$; $n = 13$). Por outro lado, houve superexpressão de *HIF1A* apenas em iCCA ($M = 2,85 \pm 0,87$; $n = 13$; $P = 0,006$), enquanto eCCA ($M = 1,13 \pm 0,68$; $n = 17$) e ACDP ($M = 0,51 \pm 0,74$; $n = 22$) mostraram semelhança com o controle relativo ($P > 0,05$, para ambos).

Na comparação entre os três grupos, a expressão gênica de *VEGFA* mostrou-se acentuada em iCCA, comparado com ACDP ($P = 0,048$), mas semelhança nas demais comparações. O mesmo ocorreu para *KDR* ($P = 0,0026$). Para *HIF1A* houve semelhança na comparação entre os três grupos (ANOVA, $P = 0,119$) (**Figura 7A**).

Quanto à análise proteica por IHQ para VEGF-A (**Figura 7B**), destacou-se a marcação difusa principalmente em ACDP (08/16; 50%) e eCCA (06/10; 60%), ocorrendo ainda em iCCA (01/05; 20%) e DPNN (01/03; 33,3%). A forma negativa de marcação foi representada também em todos os grupos, principalmente nos controles DPNN e DBNN (01/03; 33,3%, para ambos) e ACDP (05/16; 31,2%), além de iCCA (01/05; 20%) e eCCA (01/10; 10%). As marcações de citoplasma e co-expressão citoplasmática e difusa foram observadas apenas no grupo com ACDP (01/16; 6,2%, para ambos), que mostrou também marcação nuclear (01/16; 6,2%), evidenciada principalmente nos grupos controles (DBNN: 02/03; 66,7% e DPNN: 01/03; 33,3%),

enquanto a co-expressão nuclear e difusa destacou-se em iCCA (03/05; 60%) e eCCA (03/10; 30%).

Em relação à análise proteica por IHQ para HIF-1 α (**Figura 7B**), destacou-se a forma negativa representada em 100% das amostras de DPNN (02/02), observada ainda em iCCA (03/07; 42,9%), ACDP (05/12; 29,4%) e eCCA (01/06; 16,7%). Esses três grupos de pacientes apresentaram também co-expressão citoplasmática e nuclear, principalmente eCCA (03/06; 50%), seguido de ACDP (07/12; 41,2%) e iCCA (02/07; 28,6%), enquanto para DBNN em 100% (02/02) das amostras. A marcação citoplasmática foi observada apenas nos grupos eCCA (02/06; 33,3%) e ACDP (05/12 – 29,4%).

Para a marcação proteica de VEGF-R2 por IHQ (**Figura 7B**), prevaleceu a co-expressão citoplasmática e nuclear em amostras de ACDP (05/18; 27,8%), eCCA (04/09; 44,4%), iCCA (03/06; 50%) e do grupo controle DBNN (02/03; 66,7%). Observou-se também marcação citoplasmática isolada nos pacientes, com destaque para eCCA (04/09; 44,4%), seguido de ACDP (05/18; 27,8%) e iCCA (01/06; 16,7%), assim como, no grupo controle DPNN (01/03; 33,3%), enquanto a marcação nuclear isolada foi detectada apenas nos grupos com ACDP e iCCA (16,7% para ambos; 03/18 e 01/06, respectivamente). A forma negativa de marcação destacou-se nos grupos controles DPNN (02/03; 66,7%) e DBNN (01/03; 33,3%), seguido de ACDP (04/18; 22,2%), iCCA (01/06; 16,7%) e eCCA (01/09; 11,1%).

Adicionalmente, os biomarcadores proteicos (p110 α , PTEN, SMAD4, TGF- β 1, VEGF-A, HIF-1 α e VEGF-R2) e seus respectivos padrões de marcação subcelular são apresentados em conjunto em um painel demonstrando a distribuição nos grupos de pacientes e controles (**Anexo 1**).

A análise da expressão proteica (**Figura 7C**) mostrou valor de VEGF-A particularmente aumentado em amostras de eCCA (Mdn=29,1; n=10) e iCCA (Mdn=29,3; n=04), assim como em DPNN (Mdn=2,2; n=03), comparado a ACDP (Mdn=0,85; n=14) e DBNN (Mdn=0,44; n=03), embora sem significância (Kruskal-Wallis, P=0,24). Quanto a HIF-1 α , houve semelhança na expressão proteica entre ACDP (Mdn=11,3; n=16), eCCA (Mdn=19,9; n=06), iCCA (Mdn=13,2; n=07), DPNN (Mdn=16,8; n=02) e DBNN (Mdn=28,2; n=02) (Kruskal-Wallis, P=0,74). Para VEGF-R2, foram observados também valores elevados em tecido tumoral de pacientes (ACDP: Mdn=15,6; n=18; eCCA:(Mdn=14,2; n=09; iCCA: Mdn=12,7; n=06) e no grupo controle DBNN (Mdn=23,7; n=03), comparado a DPNN (Mdn=0,82; n=03), contudo, sem significância (Kruskal-Wallis, P=0,16).

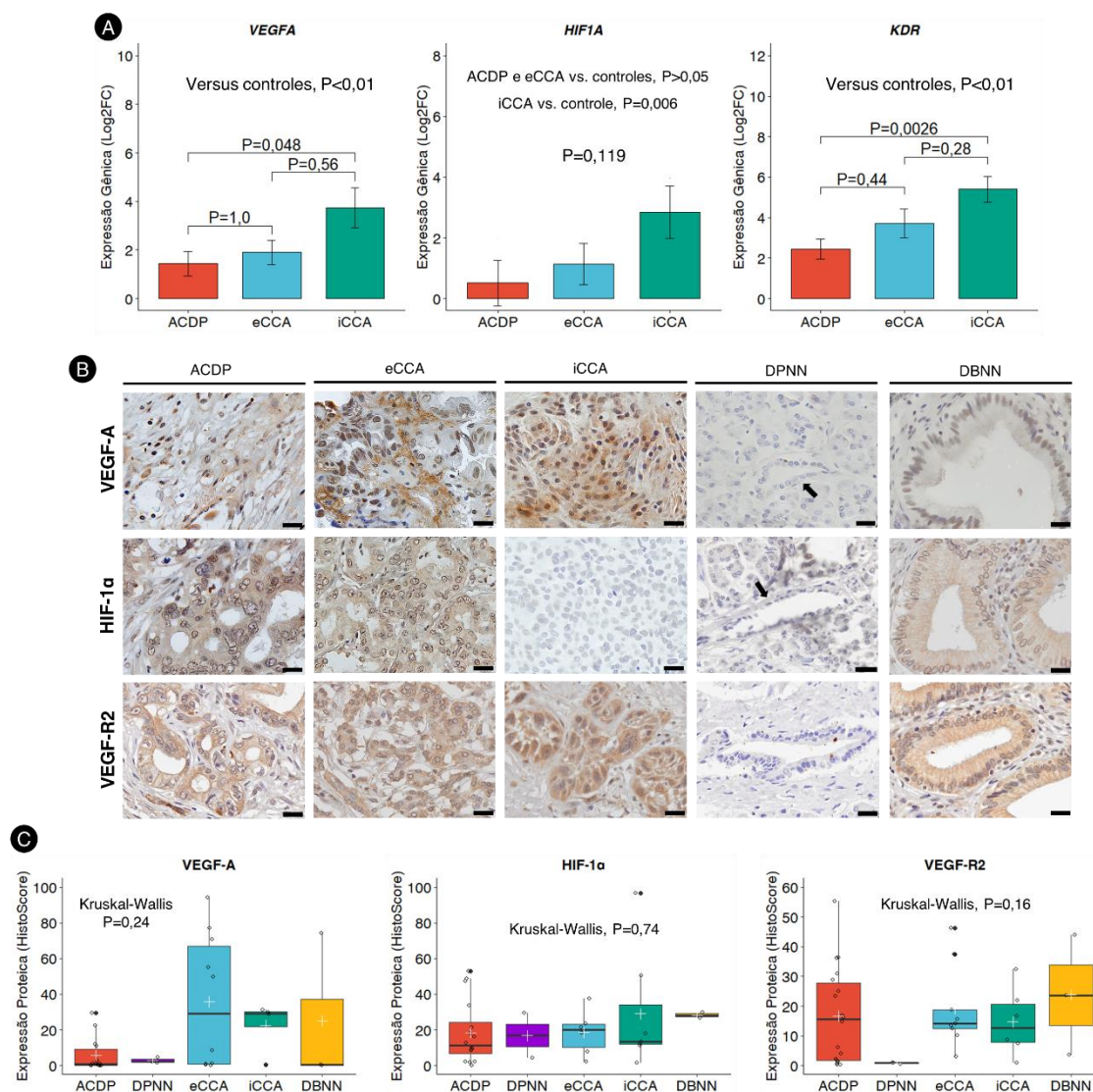


Figura 7. (A) Comparação da expressão gênica de *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A), *HIF-1α* (fator induzível por hipóxia 1 alfa), *HIF1A* (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e *KDR* (receptor com domínio de inserção de quinase) em adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), subtipos de colangiocarcinoma extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA). Barras representam média e erro padrão. (B) Padrão mais frequente de marcação na análise imuno-histoquímica de VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A), HIF-1α (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) em ACDP, eCCA, iCCA, ducto pancreático não neoplásico (DPNN) e ducto biliar não neoplásico (DBNN). As barras de tamanho representam 20 μm. (C) Comparação da expressão proteica de VEGF-A, HIF-1α e VEGF-R2 em ACDP, eCCA, iCCA, DPNN e DBNN. A cruz branca representa média.

4.5 Expressão Gênica e Proteica e Associação com Diferenciação Celular

Ao identificar padrões de marcação proteica distintos a depender de cada tipo de diferenciação celular, realizamos análises comparativas entre amostras bem, moderadamente e pouco diferenciadas para cada biomarcador. Nesse sentido, amostras pouco diferenciadas, mostraram expressão gênica aumentada de *HIF1A* (Mdn=5,17; n=02) e *TGFB1* (Mdn=7,21; n=02) em iCCA, comparado com ACDP (*HIF1A*: Mdn= -1,20; n=03 e *TGFB1*: Mdn=2,19; n=03) ($P=0,038$ e $P=0,031$, respectivamente; **Figuras 8B e 9B**). Para amostras moderadamente diferenciadas, o mesmo ocorreu quanto à expressão de *KDR* (iCCA: Mdn=6,43; n=04 e ACDP: Mdn=2,53; n=12; $P=0,035$) (**Figura 8C**) e *TGFB1* (iCCA: Mdn=7,92; n=04 e ACDP: Mdn=3,27; n=12; $P=0,0265$) (**Figura 9B**). Os demais marcadores apresentaram expressão gênica semelhante entre os grupos ($P>0,05$; **Figuras 8–10**).

Em relação à expressão proteica, TGF- β 1 mostrou-se particularmente elevado em ACDP para amostras moderadamente diferenciadas (Mdn=15,8; n=11), embora tenha sido estatisticamente semelhante a eCCA e iCCA ($P>0,05$; **Figura 9D**). Nesse sentido, a avaliação da frequência de marcação para essa proteína mostrou predominância citoplasmática em ACDP (63,3%; n=11), negativa em eCCA (50%; n=06) e citoplasmática em iCCA (50%; n=04). Importante ressaltar que a intensidade de marcação de TGF- β 1 em ACDP foi notavelmente mais acentuada do que em eCCA. Entretanto, as diferenças observadas nas frequências não foram estatisticamente relevantes ($P=0,119$; **Figura 9E**). Os demais biomarcadores demonstraram semelhança quanto à expressão proteica ($P>0,05$; **Figura 8–10**).

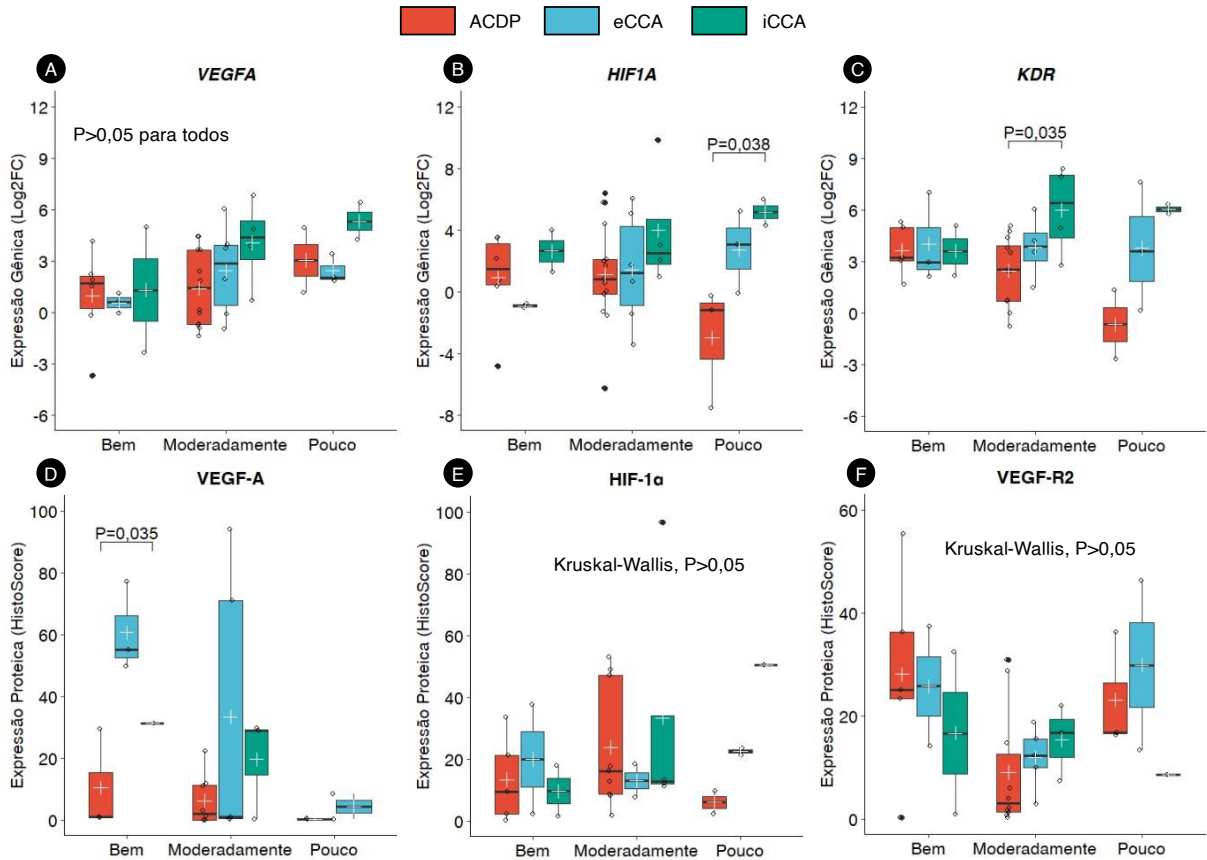


Figura 8. Expressão gênica de *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A), *HIF1A* (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e *KDR* (receptor com domínio de inserção de quinase) e proteica de VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A) HIF-1 α (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) para cada tipo de diferenciação celular em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). A cruz branca representa média.

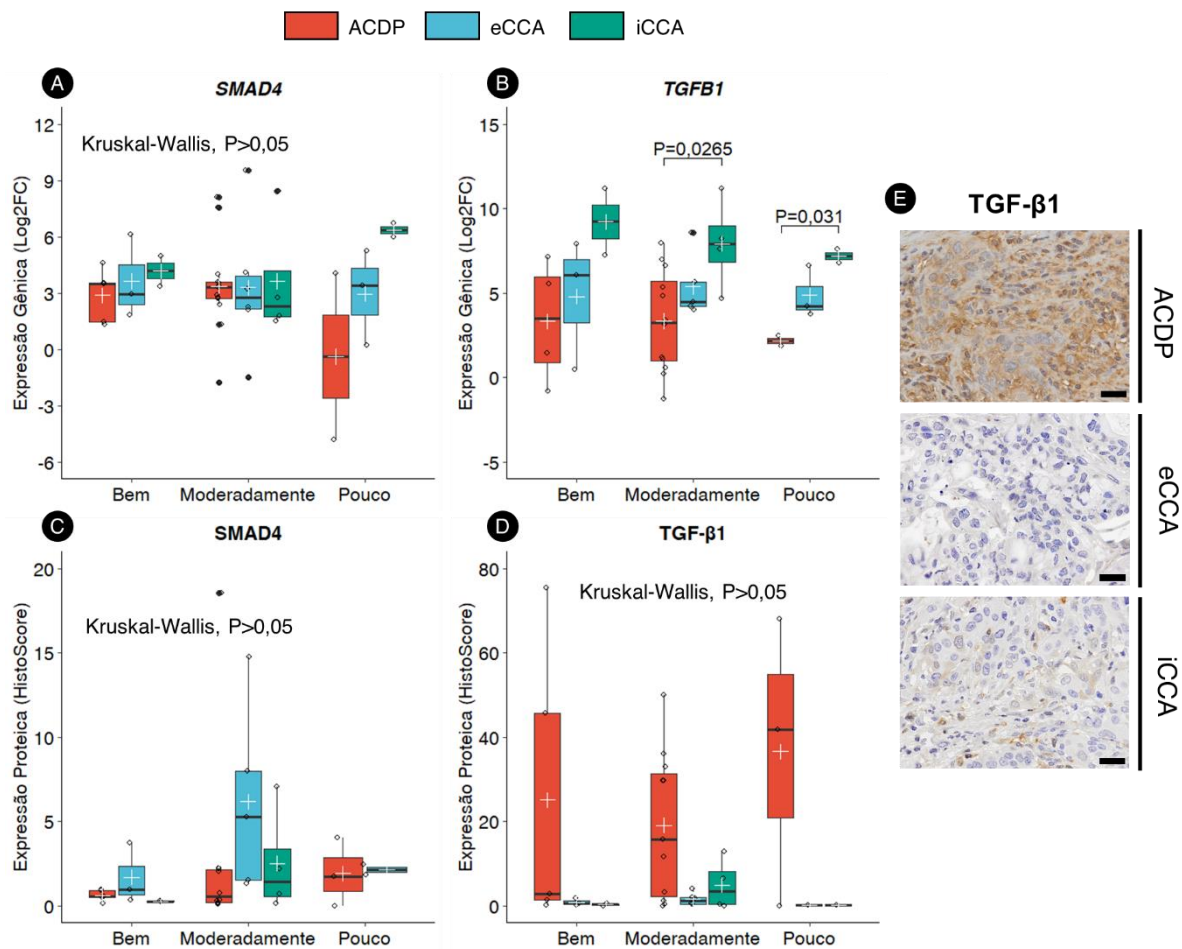


Figura 9. (A–D) Expressão gênica de *SMAD4* (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e *TGF-β1* (fator de crescimento transformador beta 1) e proteica de SMAD4 e TGF-β1 (fator de crescimento transformador beta 1) para cada tipo de diferenciação celular em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). A cruz branca representa média. (E) Padrão de marcação de TGF-β1 em amostras moderadamente diferenciadas de ACDP, eCCA e iCCA. As barras de tamanho representam 20 μm.

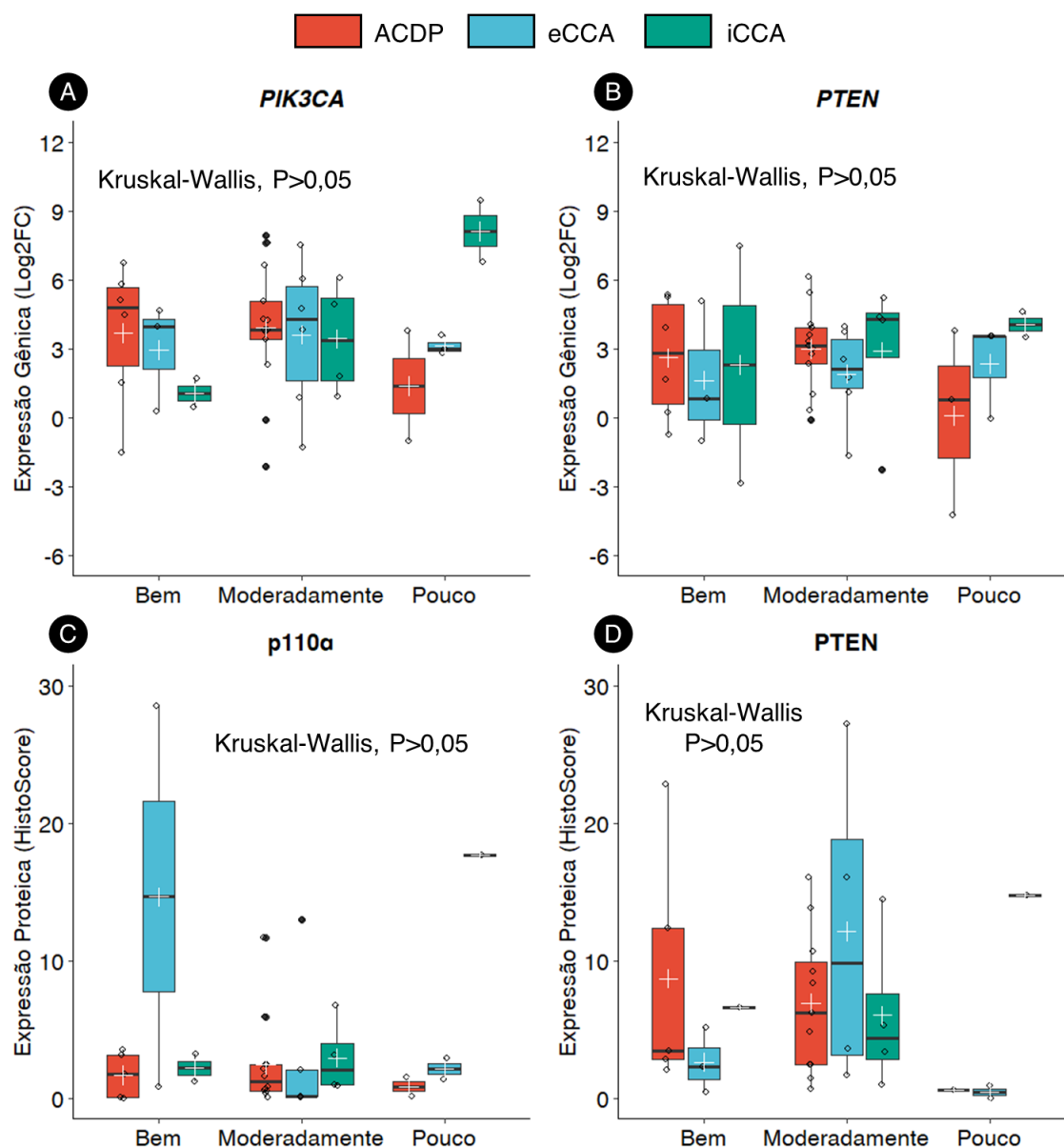


Figura 10. Expressão gênica de *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina) e proteica de p100α (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e *PTEN* para cada tipo de diferenciação celular em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). A cruz branca representa média.

4.6 Expressão Gênica e Proteica e Associação com Invasão Vascular, Linfática, Perineural e Metástase

Realizamos análise de regressão logística para predizer a presença de invasão vascular, linfática, perineural e metástase, considerando a expressão gênica e proteica dos referidos biomarcadores, contudo, não houve relação entre essas variáveis ($P > 0,05$, para todos). Entretanto, observou-se superexpressão gênica de *TGFB1* em iCCA na presença de invasão vascular (Mdn=7,27; n=07; $P=0,012$), linfática (Mdn=9,72; n=04; $P=0,023$), perineural (Mdn=9,72; n=04; $P=0,026$), assim como presença (Mdn=8,67; n=06; $P=0,031$) e ausência (Mdn=7,63; n=05; $P=0,003$) de metástase, comparado com ACDP (**Figuras 11A–D**). Adicionalmente, expressão proteica aumentada de TGF- β 1 em ACDP na presença de invasão perineural (Mdn=29,7; n=14), quando comparado com eCCA (Mdn=0,62; n=05; $P=0,033$), e presença de metástase (Mdn=22,8; n=03), quando comparado com iCCA (Mdn=0,9; n=06; $P=0,022$) (**Figura 11E–F**).

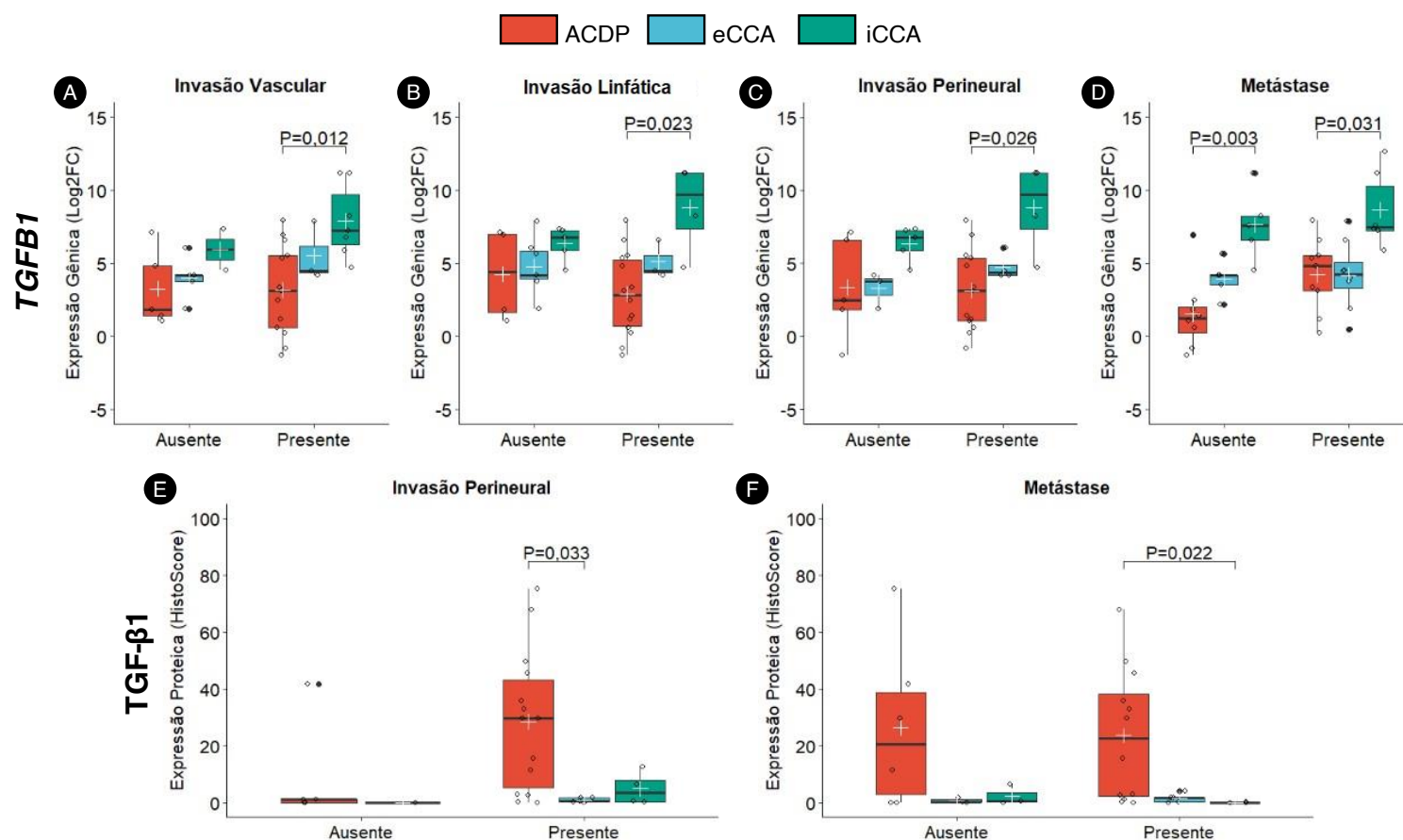


Figura 11. (A–D) Expressão gênica de *TGF-β1* (fator de crescimento transformador beta 1) para cada tipo de invasão e metástase em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). (E–F) Expressão proteica de TGF-β1 (fator de crescimento transformador beta 1) em invasão perineural e metástase em ACDP, eCCA e iCCA. A cruz branca representa média.

4.7 Expressão Gênica e Proteica e Associação com Estadiamento do Câncer

Para a análise comparativa entre os estágios das neoplasias malignas, amostras com estágios I ou II foram unidas em um mesmo grupo, assim como amostras de estágios III ou IV. Desse modo, amostras com estágios I ou II apresentaram semelhança na expressão gênica para todos os biomarcadores ($P > 0,05$, para todos). Entretanto, houve superexpressão de *VEGFA* (Mdn=4,18; n=06), *TGFB1* (Mdn=6,35; n=06) e *KDR* (Mdn=4,99; n=06) em iCCA, quando comparado com ACDP (*VEGFA*: Mdn= -0,92; n=05. *TGFB1*: Mdn=3,29; n=04. *KDR*: Mdn=2,54; n=05) em amostras com estágios III ou IV. O mesmo ocorreu na comparação entre eCCA (Mdn=4,21; n=04) e iCCA para *TGFB1* ($P < 0,05$, para todos) (**Figura 12A–C**). Os demais marcadores apresentaram semelhança em todas as comparações ($P > 0,05$, para todos).

Quanto à expressão proteica, VEGF-R2 mostrou expressão acentuada em ACDP (Mdn=23,4; n=05), comparado com eCCA (Mdn=12,4; n=03) em amostras com estágios III ou IV ($P = 0,02$) (**Figura 12D**). As amostras com estágios I ou II mostraram semelhança em ACDP, eCCA e iCCA para todos os biomarcadores ($P > 0,05$ para todos).

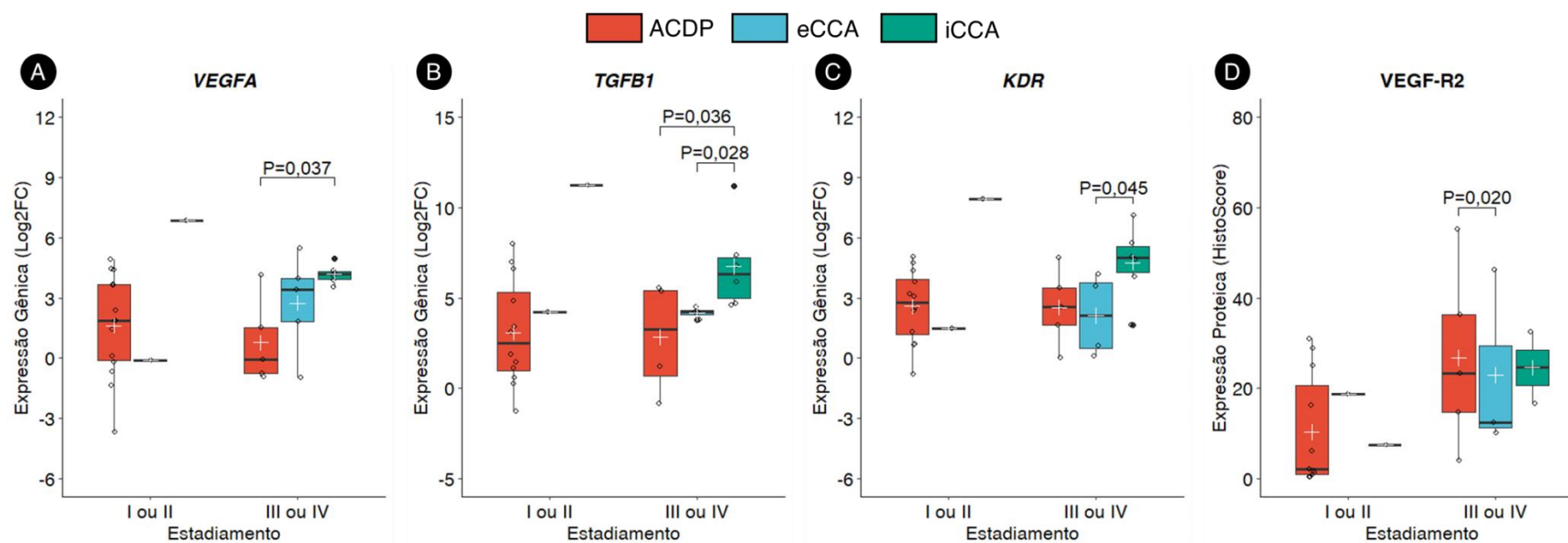


Figura 12. Expressão gênica de *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A), *TGFB1* (fator de crescimento transformador beta 1) e *KDR* (receptor com domínio de inserção de quinase) e proteica de VEGF-R2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular) para cada estadiamento em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). A cruz branca representa média.

4.8 Correlações

Quanto à correlação entre a expressão gênica dos biomarcadores, observamos correlação positiva moderada entre *PIK3CA* e *PTEN* em eCCA (R=0,59; n=17; P=0,014) e iCCA (R=0,65; n=13; P=0,018). Entretanto, isso não foi observado em ACDP (**Figura 13A**). Por outro lado, houve correlação positiva moderada entre *SMAD4* e *TGFB1* em ACDP (R=0,65; n=18; P=0,004) e iCCA (R=0,64; n=13; P=0,022), contudo, isso não foi observado em eCCA (**Figura 13B**).

Com relação à expressão gênica de *VEGFA* e *HIF1A*, observou-se correlação positiva moderada em ACDP (R=0,69; n=21; P<0,001) e eCCA (R=0,58; n=17; P=0,015), e correlação forte em iCCA (R=0,90; n=13; P<0,0001) (**Figura 13C**). Destacou-se também correlação positiva moderada entre *KDR* e *VEGFA* em ACDP (R=0,50; n=19; P=0,029), por outro lado, iCCA (R=0,79; n=13; P=0,002) apresentou forte correlação positiva (**Figura 13D**).

Para a expressão proteica, não foi observada correlação entre os biomarcadores (P>0,05, para todos).

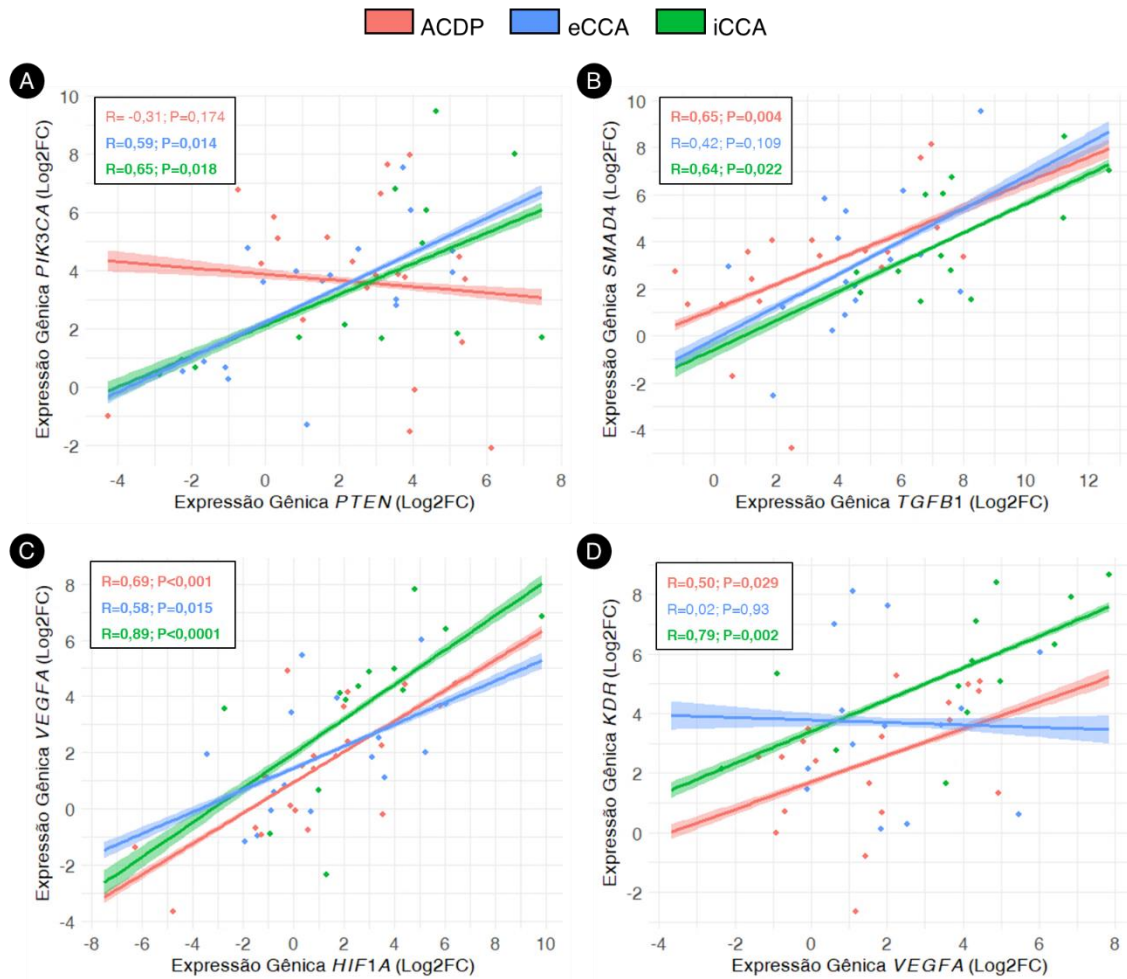


Figura 13. Gráficos de dispersão e coeficientes de correlação de Spearman (R) para correlação entre expressão genica de *PIK3CA* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa) e *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina), *SMAD4* (*mothers against decapentaplegic homolog 4*) e *TGFBI* (fator de crescimento transformador beta 1), *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A) e *HIF1A* (fator induzível por hipóxia 1 alfa) e *KDR* (receptor com domínio de inserção de quinase) em ACDP (adenocarcinoma ductal pancreático), eCCA (colangiocarcinoma, subtipo extra-hepático) e iCCA (colangiocarcinoma, subtipo intra-hepático). As sombras indicam intervalo de confiança de 95%.

4.9 Potencial Discriminatório dos Biomarcadores na Classificação Tumoral

Na análise do potencial discriminatório da expressão gênica observamos resultado satisfatório na classificação de iCCA em relação à ACDP para *TGFB1* (AUC=0,88; Sens.: 84,6%; Espec.: 77,7%), *VEGFA* (AUC=0,74; Sens.: 69,2%; Espec.: 80,9%), *HIF1A* (AUC=0,70; Sens.: 84,6%; Espec.: 59,1%) e *KDR* (AUC=0,83; Sens.: 61,5%; Espec.: 94,7%), destacando *TGFB1* como principal candidato (**Tabela 3; Figura 14A**).

Por outro lado, *PIK3CA*, *PTEN* e *SMAD4* apresentaram valores abaixo daqueles relevantes clinicamente. Para a classificação entre iCCA e eCCA, destacou-se a expressão gênica de *TGFB1* (AUC=0,86; Sens.: 100%; Espec.: 68,7%) e *VEGFA* (AUC=0,72; Sens.: 76,9%; Espec.: 76,5%) (**Tabela 3; Figura 14B**), enquanto *PIK3CA*, *PTEN*, *SMAD4*, *HIF1A* e *KDR* mostraram valores clinicamente não relevantes. Ainda, todos os biomarcadores na classificação entre eCCA e ACDP apresentaram valores abaixo daqueles clinicamente relevantes.

Em relação ao poder discriminatório da expressão proteica, foram observados valores satisfatórios de VEGF-A (AUC=0,82; Sens.: 75%; Espec.: 92,9%; P=0,045), p110 α (AUC=0,72; Sens.: 100%; Espec.: 47,4%; P=0,049) e de TGF- β 1 (AUC=0,78; Sens.: 100%; Espec.: 52,6%; P=0,003) na classificação de iCCA e ACDP (**Tabela 3**).

Destacou-se na classificação entre eCCA e ACDP a expressão proteica de *SMAD4* (AUC=0,77; Sens.: 90%; Espec.: 66,6%; P=0,003), VEGF-A (AUC=0,74; Sens.: 50%; Espec.: 100%; P=0,033) e TGF- β 1 (AUC=0,76; Sens.: 90%; Espec.: 68,4%; P=0,003) (**Tabela 3; Figura 14D**). As demais proteínas apresentaram valores abaixo daqueles clinicamente relevantes. Em relação à classificação entre iCCA e eCCA todos os biomarcadores apresentaram valores não relevantes clinicamente.

Tabela 3. Valores de ponto de corte (*cutoff*), área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95% (IC 95%), sensibilidade e especificidade para o potencial discriminatório das expressões gênicas e proteicas de biomarcadores da carcinogênese para classificação de adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) e colangiocarcinoma dos subtipos extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA).

iCCA versus ACDP						
Gene	<i>cutoff</i>	AUC	IC 95%	Sensibilidade %	Especificidade %	P
<i>TGFB1</i>	>5,74	0,88	0,76–0,99	84,6	77,7	<0,0001
<i>VEGFA</i>	>3,77	0,74	0,54–0,93	69,2	80,9	0,018
<i>HIF1A</i>	>0,9	0,70	0,51–0,88	84,6	59,1	0,037
<i>KDR</i>	>5,1	0,83	0,68–0,98	61,5	94,7	<0,0001
Proteína	<i>cutoff</i>	AUC	IC 95%	Sensibilidade %	Especificidade %	P
p100α	>0,87	0,72	0,50–0,94	100	47,4	0,049
TGF-β1	<14,35	0,78	0,60–0,97	100	52,6	0,003
VEGF-A	>25,6	0,82	0,51–1,0	75	92,9	0,045
eCCA versus ACDP						
Proteína	<i>cutoff</i>	AUC	IC 95%	Sensibilidade %	Especificidade %	P
SMAD4	>0,96	0,77	0,59–0,95	90	66,6	0,003
TGF-β1	<2,41	0,76	0,59–0,94	90	68,4	0,003
VEGF-A	>39,6	0,74	0,52–0,95	50	100	0,033
iCCA versus eCCA						
Gene	<i>cutoff</i>	AUC	IC 95%	Sensibilidade %	Especificidade %	P
<i>TGFB1</i>	>4,56	0,86	0,73–1,0	100	68,7	<0,0001
<i>VEGFA</i>	>3,49	0,72	0,51–0,93	76,9	76,5	0,037

TGFB1 e TGF-β1 = fator de crescimento transformador beta 1. *VEGFA* e VEGF-A = fator de crescimento endotelial vascular A. *HIF1A* = fator induzível por hipóxia 1 alfa), *KDR* = receptor com domínio de inserção de quinase. SMAD4 = *mothers against decapentaplegic homolog 4*.

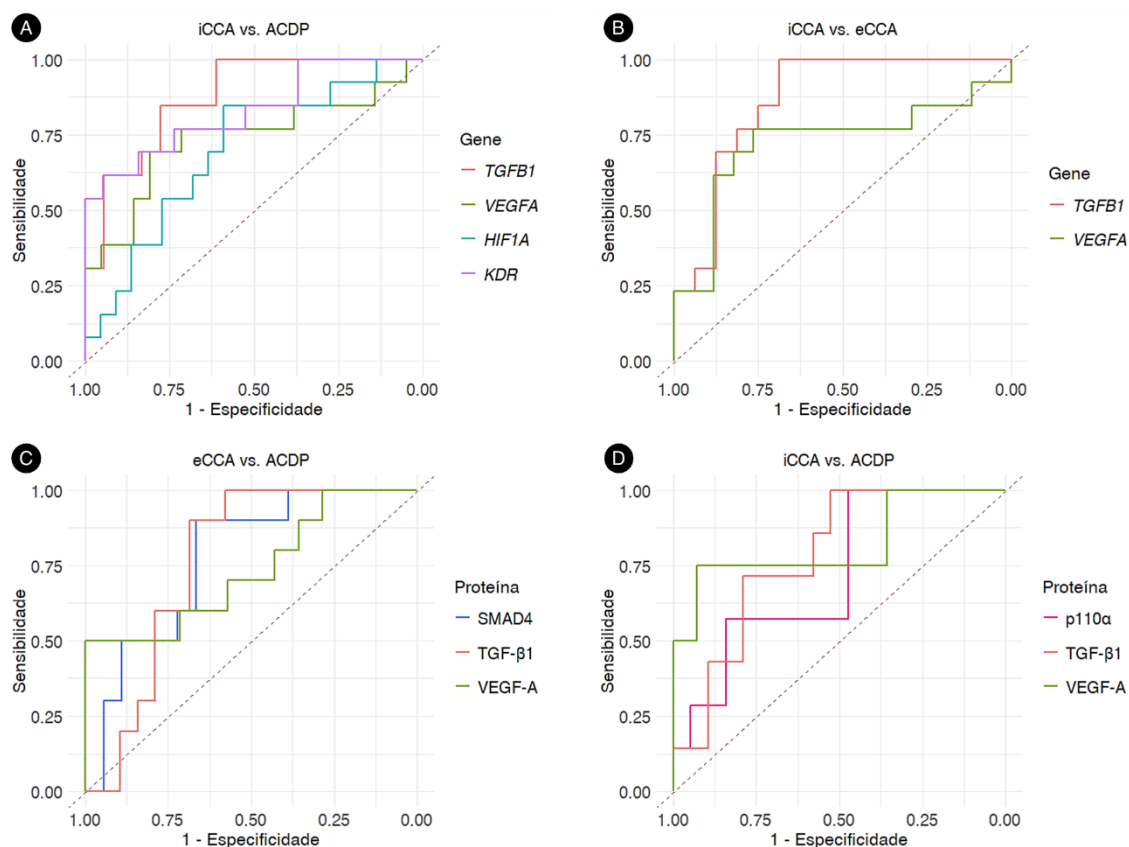


Figura 14. Curva ROC (Característica de Operação do Receptor) do potencial discriminatório da expressão gênica e proteica de biomarcadores da carcinogênese para classificação de adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), e colangiocarcinoma dos subtipos extra (eCCA) e intra-hepático (iCCA). *TGFB1* e TGF- β 1 = fator de crescimento transformador beta 1. *VEGFA* e VEGF-A = fator de crescimento endotelial vascular. *HIF1A* = fator induzível por hipóxia 1 alfa), *KDR* = receptor com domínio de inserção de quinase. SMAD4 = *mothers against decapentaplegic homolog 4*.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste estudo evidencia-se em tecido tumoral de pacientes com neoplasias biliopancreáticas (ACDP e CCA) superexpressão dos oncogenes *PIK3CA*, *VEGFA*, *KDR* e *HIF1A* (apenas em iCCA) e supressores tumorais *PTEN*, *SMAD4*, *TGFB1*, comparado com os tecidos não neoplásicos. Trata-se de genes com funções distintas em diversas vias incluindo angiogênese, proliferação, migração, invasão e sinalização celular e apoptose. Por outro lado, houve semelhança das respectivas expressões proteicas entre os grupos de pacientes e com os controles. Entretanto, as análises de expressão proteica demonstraram padrão heterogêneo na marcação celular, identificando proteínas que podem diferenciar neoplasias biliopancreáticas (40,41,43,47,48,53–55,82,83).

5.1 PI3KCA/PTEN

Analizamos a expressão gênica e proteica de *PIK3CA* (p110 α) e *PTEN* com funções distintas e antagônicas, um apresenta-se como oncogene e o outro supressor tumoral, respectivamente. Ambos mostraram superexpressão gênica em tecido tumoral de pacientes com ACDP, eCCA e iCCA, mas semelhança para expressão proteica, comparado aos controles. Por outro lado, análises de enriquecimento diferencial indicam atividade proeminente e constante da via *PI3K/Akt/mTOR* em ACDP e suas células metastáticas, em comparação ao tecido peri-tumoral normal (82). Além disso, embora tenhamos encontrado semelhança na expressão proteica de p110 α em todos os grupos, um estudo mostrou superexpressão dessa proteína em ACDP e, em conjunto com lesões pancreáticas, a via de sinalização *PI3K* parece estar envolvida na iniciação de lesões pré-neoplásicas no pâncreas (84). Outro estudo encontrou supressão da atividade de *Akt*, redução de CA 19-9, além de diminuição do tamanho tumoral em paciente com ACDP e

perda de PTEN, após o uso de MK-2206, um inibidor alostérico de Akt (85), destacando assim o papel crucial dessa via na progressão do ACDP.

É bem estabelecido que mutações em *PIK3CA* no câncer de pâncreas produzem formas ativas constitutivas da proteína p110 α codificada por esse gene, e contribuindo para a tumorigênese pancreática (86), assim como, em neoplasias do trato biliar, incluindo eCCA, iCCA, e vesícula biliar (87). Ressalta-se que mutações em *PIK3CA* frequentemente ocorrem com várias outras alterações genéticas promotoras de tumores (87). Desse modo, além de expressão gênica para *PIK3CA* e respectiva proteína, ora apresentada, a avaliação dos demais constituintes da via PI3K/Akt/mTOR e a identificação de mutações, poderá caracterizar subgrupos de pacientes contribuindo para diagnóstico, prognóstico e tratamento de neoplasias biliopancreáticas.

Neste estudo, embora com semelhança entre pacientes e controles em relação à expressão proteica, a análise por IHQ e quantitativa por HistoScore evidenciaram predomínio de expressão citoplasmática de p110 α em ACDP, iCCA e eCCA, enquanto nos tecidos não neoplásicos destacou-se negatividade. A oncoproteína p110 α desempenha múltiplas funções celulares que favorecem o crescimento tumoral, e é frequentemente encontrada em níveis elevados em neoplasias malignas (40,41,43,82,83). No entanto, devido aos padrões de marcação semelhante ora observados em tecido tumoral de ACDP e ambos os subtipos de CCA, a marcação imuno-histoquímica de p110 α não contribui para o diagnóstico diferencial dessas neoplasias.

Em relação à PTEN, supressor tumoral com ação no ciclo celular, apoptose, adesão, migração e diferenciação celular (40–43), observamos inesperadamente superexpressão gênica em tecido de ACDP, eCCA e iCCA. No entanto, há referência de redução de expressão gênica e proteica de PTEN em casos de iCCA, em comparação com

o tecido adjacente (88), assim como, diminuição na marcação proteica em câncer de pâncreas, comparado à pancreatite crônica (89). Adicionalmente, foram observadas alterações na expressão de *PTEN* juntamente com *TP53*, gene supressor tumoral envolvido no ciclo celular e apoptose, em pacientes com iCCA, sugerindo possíveis disfunções em múltiplos processos celulares relacionados ao crescimento tumoral, invasão e resistência à tratamentos (90).

Outras vias podem estar envolvidas na regulação e, consequentemente, na expressão gênica e proteica de *PTEN*, a ser esclarecido para as neoplasias malignas biliopancreáticas. Há referência de regulação da expressão de *PTEN* em câncer de pâncreas por *TGFB1*, visto que a superexpressão de *TGFB1* em células humanas e ratos transgênicos reduziu consideravelmente a expressão de *PTEN* (91). Isso contrasta com nossos achados, sendo que ambos os genes estão superexpressos em ACDP. São escassos estudos que abordam a expressão de p110 α e *PTEN* comparativamente entre ACDP, eCCA e iCCA, conferindo relevância a este trabalho. Entretanto, tornam-se necessários estudos com maior tamanho amostral para confirmar esse padrão de expressão.

É interessante que nesta casuística, embora com superexpressão de *PTEN* em tecidos neoplásicos, a expressão proteica foi semelhante entre os grupos, sugerindo a participação de outros fatores, incluindo os fatores epigenéticos, assim como microRNAs (miRNAs), regulando a via *PTEN*/PI3K. A propósito, *PTEN* é alvo de miR-21-3p que modula negativamente sua expressão (92). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em CCA demonstraram correlação negativa desse miRNA com a expressão proteica de *PTEN*, embora sem relação com a expressão gênica (no prelo). Desse modo, o aumento desse oncomiR pode influenciar a expressão proteica de *PTEN* comprometendo, portanto, sua função como supressor tumoral.

Identificou-se que o gene *PTEN* é um alvo direto também do miR-221-5p em linhagens celulares de eCCA. A regulação positiva desse miRNA está associada ao crescimento celular, metástase e indução de invasão em eCCA, resultando na supressão da expressão proteica do PTEN (93). Nesse contexto, esse mecanismo poderia explicar a superexpressão gênica de PTEN nos pacientes ora estudados, mas com expressão proteica semelhante aos controles, o que deve ser confirmado em estudos futuros. Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa, por meio de análises de bioinformática, mostrou em CCA interação também do miR-101-3p com *PTEN* (no prelo). Esta associação foi observada, ainda, em carcinoma hepatocelular com redução da expressão gênica relacionada à expressão elevada de miR-101-3p (oncomiR) e ao mau prognóstico (94).

Em relação à expressão proteica de PTEN, embora semelhante entre os grupos, identificamos predominância de co-expressão citoplasmática e nuclear em ACDP, iCCA e DBNN, enquanto marcação negativa destacou-se em eCCA e DPNN. Esses achados corroboram um estudo com marcação citoplasmática e nuclear em câncer pancreático (91). Outro estudo revelou marcação moderada para PTEN na maioria das amostras de ACDP, por outro lado, o tecido normal apresentou marcação mais intensa e prevalente, sugerindo a perda do gene no tecido neoplásico (44). No presente estudo, tendo em vista esses mesmos mecanismos para iCCA e DBNN, esse padrão de expressão sendo exclusivo desses tumores pode auxiliar no diagnóstico diferencial de ACDP e eCCA, especialmente considerando o predomínio de marcação negativa em eCCA. No entanto, para confirmar essas hipóteses é necessário ampliar a amostragem, assim como análise dos mecanismos moleculares subjacentes.

5.2 SMAD4/TGF- β 1

Neste estudo, evidenciou-se superexpressão gênica de *TGFB1* e *SMAD4*, fator de transcrição mediador central da via de sinalização de TGF- β (48) responsável por vários processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, migração, bem como mecanismos envolvendo a carcinogênese (95). A proteína TGF- β tem função dupla, atua na carcinogênese como supressor tumoral, induzindo a parada do ciclo celular e apoptose nos estágios iniciais da formação do tumor. Entretanto, com o crescimento tumoral as células gradualmente tornam-se insensíveis a TGF- β , e a proteína secretada compromete a resposta imunológica favorecendo, conseqüentemente, a angiogênese, invasão celular e metástase (47,48,96). Neste estudo, mais de 80% dos casos de CCA e 30% de ACDP foram classificados com estadiamento III ou IV, e na maioria, em ambos os casos, evidenciou-se células moderadamente diferenciadas, demonstrando a evolução e gravidade dessas neoplasias biliopancreáticas.

Nesse caso, *SMAD4*, o principal mediador da via de sinalização de TGF- β desempenha um papel fundamental na mudança de função do TGF- β na tumorigênese. A atuação de *SMAD4* favorece a permanência das células na fase G1 da divisão celular, ocasionando a parada do ciclo celular (97). Entretanto, várias vias interagem ao longo de toda a cadeia de sinalização e interação da via TGF- β /*SMAD4*, incluindo MAPK (proteína quinase ativada por mitogênio), PI3K/AKT e WNT/ β -catenina (98), podendo influenciar, portanto, na expressão gênica de *SMAD4*. Adicionalmente, é notório o acúmulo de alterações em genes críticos na carcinogênese (99).

Deleção de *SMAD4* é esperada em mais da metade das amostras de ACDP (47), que geralmente ocorre no estágio de carcinoma histologicamente reconhecível, em fases mais avançadas da progressão tumoral (100), indicando prognóstico desfavorável (101). Entretanto, perda da expressão de *SMAD4* observada em menor frequência em

adenocarcinomas pancreáticos (101) sugere influência do microambiente tumoral na heterogeneidade da expressão gênica, bem como, variações nas populações e técnicas utilizadas nos estudos. Além disso, a expressão de *SMAD4* pode estar aumentada em certos contextos, cuja função no desenvolvimento e progressão tumoral do ACDP ainda não é completamente compreendida (47).

Neste estudo, embora observado predominância de marcação negativa para *SMAD4* em ACDP e iCCA, sugerindo a deleção de *SMAD4* como uma característica não só de ACDP, como de iCCA, ressalta-se também essa forma de marcação em DPNN e DBNN. No entanto, o tamanho amostral reduzido alerta para a interpretação cautelosa desses resultados, uma vez que outros componentes moleculares possam estar influenciando a expressão de *SMAD4*.

Em relação a outros tipos de câncer, foi observada superexpressão de *SMAD4* em carcinoma hepatocelular (102) e subexpressão gênica e proteica de *SMAD4* em câncer colorretal (103,104), além de negatividade em câncer de pulmão e endométrio (104). Adicionalmente, Ali et al. encontraram predominância de marcação nuclear de *SMAD4* (80%) em adenocarcinoma pancreático (104), enquanto no presente estudo destacou-se marcação negativa em ACDP, também representada expressivamente nos demais tipos tumorais, exceto para eCCA com maior frequência de marcação citoplasmática (80%). A deleção de *SMAD4*, esperada em mais da metade dos casos, exerce influência na interação com TGF- β 1, cuja condição normal resulta na translocação da proteína *SMAD4* para o núcleo, onde recruta fatores transcricionais que atuam na supressão de tumores (47,48,50,51), desse modo, resultados divergentes podem ser atribuídos à heterogeneidade tumoral.

Neste estudo, *TGFB1* também se mostrou superexpresso em todos os tipos de câncer, em comparação aos tecidos não neoplásicos. Ressalta-se valores mais elevados em iCCA em relação a ACDP e eCCA, principalmente em amostras de estágio III ou IV de iCCA, que representa a maioria dos casos, comparado à ACDP nessa condição. No entanto, em ACDP, com prevalência de estadiamento I ou II, observou-se também expressão aumentada de *TGFB1*, concordante com outro estudo (105). Nesse contexto, é possível que *TGFB1* desempenhe papéis diferentes em iCCA em estágios avançados. A propósito, o grupo com iCCA mostrou expressão acentuada de *TGFB1* em células moderadamente e pouco diferenciadas em relação à ACDP, condição mais agressiva e com prognóstico pior (106).

Por outro lado, há referência de expressão aumentada de *TGFB1* relacionada com maior sobrevida em pacientes com ACDP (105), mas, redução na sobrevida com invasão linfática (105). Outros autores observaram expressão proteica aumentada de TGF- β 1 associada à invasão linfovascular e metástases distantes de iCCA (107). Além disso, é amplamente reconhecido que características como invasão e metástase estão intimamente relacionadas a um prognóstico desfavorável para pacientes com câncer. A propósito, neste estudo, o grupo com iCCA mostrou expressão gênica de *TGFB1* acentuada na presença de invasão vascular, linfática e perineural, assim como na presença e ausência de metástases, comparado com ACDP. Estes achados sustentam que a alta expressão de *TGFB1* pode aumentar a probabilidade desses tipos de invasão e metástases (48,108) em iCCA.

Este gene tem funções diversas e complexas no contexto do câncer, atuando tanto em mecanismos envolvidos na promoção, invasão e a metástase tumoral, quanto na supressão da progressão tumoral, dependendo do tipo de tumor e do microambiente em

que está inserido (48,108). Portanto, a relação entre a expressão de *TGFB1* e a sobrevivência dos pacientes com câncer pode ser influenciada por uma interação complexa entre múltiplos fatores moleculares.

Por outro lado, paradoxalmente, observamos a proteína TGF- β 1 aumentada em ACDP com presença de invasão perineural e metástase, em relação à eCCA e iCCA, respectivamente, o que sugere atuação distinta de TGF- β 1 em invasão perineural e metástases. A propósito, há referência de regulação positiva dos genes *BMP5* (proteína morfogenética óssea 5) e *INHBE* (subunidade beta E da inibina), membros da família de *TGFB1*, em carcinoma espinocelular cutâneo de cabeça e pescoço, com presença de invasão perineural extensa (109). Embora *TGFB1* em nosso estudo esteja menos expresso em ACDP, comparado com iCCA, outro estudo mostrou que BMP5 contribui também para invasão em câncer pancreático (110).

Adicionalmente, TGF- β 1 promove a produção de IL-6 (interleucina-6), e a interação funcional entre TGF- β 1 e IL-6 tem sido associada ao crescimento das células iCCA. Esse mecanismo sugere uma possível via de sinalização colaborativa entre o TGF- β 1 e a IL-6 (111). Portanto, a via de *TGFB1* parece atuar de forma distinta na invasão perineural de ACDP e iCCA, cujos mecanismos devem ser elucidados, o que poderá contribuir para o diagnóstico diferencial e prognóstico de ACDP e CCA, assim como o desenvolvimento de alvos terapêuticos e estratégias de intervenção.

Em relação à análise de expressão proteica de TGF- β 1 que se mostrou semelhante em todos os grupos, destacou-se a marcação citoplasmática nessa ordem ACDP, eCCA, DPNN e iCCA. Por outro lado, marcação negativa foi observada com maior frequência em DBNN, seguido de DPNN, iCCA, eCCA e ACDP. Na literatura, há evidências de negatividade de TGF- β 1 também para DBNN e positividade em iCCA, cujo padrão de

marcação apresenta-se bastante heterogêneo (107). Em nosso estudo, observamos negatividade para ambos, enquanto em ACDP predominou a marcação citoplasmática. Evidenciou-se nesta série co-expressão citoplasmática e nuclear em ACDP e iCCA, enquanto a marcação nuclear apenas em eCCA, o que pode favorecer a diferenciação com ACDP.

Uma vez que identificamos padrões de marcação proteica distintos em relação ao tipo de diferenciação celular, realizamos análises comparativas entre amostras bem, moderadamente e pouco diferenciadas para cada biomarcador. Deste modo, destacou-se marcação citoplasmática intensa de TGF- β 1 em ACDP, fraca em iCCA, e marcação negativa em eCCA. Embora sem significância estatística esse achado sugere que amostras de ACDP moderadamente diferenciadas expressam TGF- β 1 em maior intensidade do que eCCA e iCCA, o que pode ser uma característica específica de ACDP. Porém, são necessários estudos em casuísticas mais numerosas para confirmar essa hipótese de extrema relevância para o diagnóstico diferencial de eCCA e ACDP.

5.3 VEGF-A/VEGF-R2/HIF-1 α

Encontramos *VEGFA* e *KDR* superexpressos nos três grupos, em comparação aos tecidos não neoplásicos. Uma vez que o tecido tumoral frequentemente gera um microambiente hipóxico, a superexpressão desses genes envolvidos na angiogênese é esperada (53–55). Por outro lado, iCCA destacou-se com expressões mais elevadas de *VEGFA* e *KDR*, comparado com ACDP. Em vários tipos de câncer, como carcinoma hepatocelular, câncer gástrico, câncer renal e carcinoma espinocelular cutâneo, tem sido evidenciado que vários miRNAs que compartilham sequências de reconhecimento de *VEGFA* são superexpressos. Esses miRNAs têm a capacidade de reduzir a angiogênese,

a proliferação celular e a invasão, além de promover a apoptose (55,112). Desse modo, investigar os miRNAs inibidores de *VEGFA* diferencialmente expressos poderia explicar o padrão distinto de expressão observado, além de revelar outros alvos moleculares regulados por esses RNAs não codificadores. Essa abordagem tem o potencial de identificar biomarcadores para o diagnóstico diferencial dessas doenças, atualmente motivo de estudos por nosso grupo de pesquisa.

Adicionalmente, é reconhecido que diferentes regiões do RNA mensageiro de *VEGFA* desempenham papéis cruciais, tanto na sua rápida degradação sob condições de normóxia, quanto na estabilização em resposta à hipóxia (113). Além disso, HIF-1 α desempenha função essencial na transcrição de *VEGF-A* (57). Neste estudo, houve aumento significativo de *VEGFA* em iCCA, comparado a ACDP. Nesse caso, o perfil anatomopatológico do grupo com ACDP, representado principalmente pelo estadiamento I ou II que demonstra menor grau de tumorigênese em relação a ambos os grupos de CCA, com a maioria dos pacientes com estadiamento III ou IV, pode ter contribuído para a redução da expressão de *VEGFA*, ainda considerando que ACDP é um câncer notadamente não vascularizado (56).

No entanto, para a expressão gênica de *HIF1A*, embora mais elevada em todos os tecidos tumorais, comparado aos controles, não mostrou significância entre iCCA e ACDP. No entanto, ressalta-se que a maioria das amostras de ACDP deste estudo foram classificadas como estágio I ou II, indicando provavelmente uma vascularização mais eficiente e menor hipóxia nesses estágios iniciais. É reconhecido que tumores com diâmetro inferior à 1 mm são avasculares e o crescimento tumoral induz a angiogênese, sendo que, falhas na angiogênese podem restringir o tamanho tumoral a 2-3 mm (114).

Portanto, investigações futuras comparando a vascularização tumoral entre os estágios podem elucidar a relação entre a expressão de *HIF1A* e a progressão tumoral em ACDP.

Amostras de iCCA em estágio III ou IV, comparado com ACDP, além de expressão acentuada de *VEGFA*, apresentaram também aumento da expressão de *KDR*, que codifica VEGF-R2, o receptor para VEGF-A. Nesse caso, sua ativação promove mitose e permeabilidade de células endoteliais, assim como proliferação, migração, invasão e sobrevivência celular durante a angiogênese (53,54). Por outro lado, evidenciou-se expressão proteica acentuada de VEGF-R2 em amostras de ACDP de estágio III ou IV, comparado com eCCA. É esperado que esses genes e essa proteína se tornem mais expressos conforme o câncer progride e aumenta seu tamanho (53–55). Nesse contexto, mecanismos moleculares distintos parecem regular a expressão de *VEGFA*, *KDR* e VEGF-R2 e devem ser ainda esclarecidos nas neoplasias biliopancreáticas.

Em ACDP e eCCA, encontramos principalmente marcação difusa de VEGF-A em estroma, possivelmente devido à proteína secretada pelas células tumorais em resposta ao microambiente hipóxico (56). Entretanto, diferentemente, outros autores observaram predominância de expressão citoplasmática de VEGF-A em ACDP (115), enquanto neste estudo esse tipo de marcação foi observada principalmente em eCCA. Por outro lado, a co-expressão difusa e nuclear observada apenas em iCCA e eCCA, assim como a co-expressão citoplasmática apenas em ACDP, diferenciam CCA e ACDP. Embora a localização nuclear de VEGF seja pouco reportada e estudada, evidenciou-se que a proteína HuR (antígeno humano R), uma proteína de ligação ao RNA, é capaz de se ligar ao RNA mensageiro de VEGF e estabilizá-lo, o que é crucial para a indução hipóxica de VEGF (116).

Além disso, os mesmos autores observaram a colocalização de HuR e VEGF no núcleo celular em condições de hipóxia, sugerindo que HuR pode desempenhar um papel na translocação de VEGF do citoplasma para o núcleo ou na tradução nuclear de VEGF (117). Portanto, é possível que esses ou outros mecanismos similares ocorram em iCCA, mas não em eCCA e ACDP. A propósito, neste estudo a co-expressão difusa e nuclear de VEGF-A foi observada em 60% dos casos de iCCA e 30% de eCCA, enquanto ACDP mostrou apenas 6,2% de marcação nuclear. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese e compreender completamente os mecanismos subjacentes.

Outros estudos encontraram expressão citoplasmática mais acentuada de VEGF-A em iCCA do que em eCCA (118). No entanto, alterações na expressão de VEGF-A no citoplasma foi observada em diferentes estudos, com variação na intensidade das marcações (119,120). Adicionalmente, há referência de ampla gama de marcações de VEGF-A no citoplasma de amostras de CCA, embora sem relato de discriminação entre os subtipos da doença (121).

Ressalta-se, ainda, neste estudo predominância de expressão nuclear de VEGF-A em DBNN e DPNN. Há evidência de translocação desta proteína para o núcleo de células epiteliais endoteliais da aorta em resposta a estímulos específicos, como lesões (122). Embora com tamanho amostral reduzido neste estudo, é plausível sugerir que, em certas condições ou estímulos, como reparo tecidual, regeneração, inflamação ou outros eventos biológicos, o VEGF-A seja transportado para o núcleo das células de tecido não neoplásico de ambos os grupos controles. Ainda, assim como o transporte de VEGF-A para o núcleo é mediado por VEGF-R2 (122), outros mecanismos específicos podem estar envolvidos nesse processo.

Encontramos padrões de marcação proteica de VEGF-R2 semelhante entre os tipos de câncer, com destaque para citoplasmática em eCCA e ACDP, mas também em DPNN, enquanto co-expressão citoplasmática e nuclear em DBNN, iCCA, eCCA, assim como ACDP em menor frequência. Há referência de translocação de VEGF-R2 para o núcleo em células endoteliais, por meio de sua ativação por VEGF, o que regula sua própria transcrição. No núcleo, VEGF-R2 interage com proteínas nucleares, como o fator de transcrição Sp1 (proteína de especificidade 1) que regula diversos genes relacionados à angiogênese, como o próprio *VEGF* (123).

Uma vez que Sp1 está regulado positivamente em CCA, devido à fosforilação por aPKC- ι (proteína quinase C atípica iota) em Ser59 (serina na posição 59) (124), pode-se especular que a fosforilação de Sp1 por aPKC- ι em CCA desempenha um papel na regulação da translocação nuclear de VEGF-R2 em eCCA e iCCA, assim como em ACDP. Esses diferentes padrões de marcação proteica de VEGF-R2 e suas interações com fatores de transcrição nucleares como Sp1, se investigados mais profundamente, poderão fornecer informações importantes para o diagnóstico diferencial de CCA e ACDP. A translocação nuclear, regulação da expressão e sinalização intracelular de VEGF-R2 em colangiócitos de DBNN, permanece inexplorada (125).

Em relação à expressão gênica de *HIF1A*, ressalta-se neste estudo iCCA, o único grupo com valores mais elevados, comparado aos tecidos não neoplásicos, corroborando outro estudo, nessas mesmas condições (60). Nesse caso, os autores confirmaram que o RNA circular (circRNA) hsa_circ_0,019,054 regula positivamente a expressão de *HIF1A*, tendo como alvo o miR-340-5p em células de iCCA (60). É possível que esse circRNA não codificante, com expressão aumentada em iCCA, tenha expressão reduzida em eCCA

e ACDP, aumentando a expressão de miR-340-5p, que, por sua vez, reduz a expressão de *HIF1A* (60).

Também observamos expressão aumentada de *HIF1A* e de *KDR* em amostras de iCCA pouco diferenciadas e moderadamente diferenciadas, respectivamente, comparado com ACDP nas mesmas condições. Os mecanismos envolvidos na expressão distinta desses dois genes com estas características permanecem especulativos, evidenciando o ineditismo de nosso estudo. É possível que vias reguladoras envolvendo mecanismos moleculares distintos modulam esses genes de acordo com o microambiente específico nos diferentes tipos tumorais.

A análise de expressão proteica por IHQ mostrou co-expressão citoplasmática e nuclear de HIF-1 α em eCCA, ACDP e iCCA, embora este último em menor frequência, que, no entanto, foi o único que mostrou marcação nuclear de HIF-1 α (28,6%). Em contextos de hipóxia, HIF-1 α é translocado para o núcleo e estimula a expressão de diversos fatores reguladores da angiogênese, como VEGF-A (57,126). Por outro lado, embora iCCA tenha apresentado padrão heterogêneo para a expressão de HIF-1 α , houve predominância para negatividade. Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na regulação de HIF-1 α em iCCA. Ressalta-se que o RNA não codificante hsa_circ_0,019,054 atua na supressão da expressão gênica de *HIF1A*, o que, por sua vez, poderia reduzir a expressão proteica deste biomarcador (60). No entanto, o padrão distinto de marcação de HIF-1 α em iCCA pode contribuir para o diagnóstico diferencial dessas doenças, fornecendo informações importantes sobre os mecanismos envolvidos e direcionando a identificação de marcadores específicos. Ainda, nesse contexto, houve negatividade para DPNN. Uma vez que não há microambiente hipóxico no tecido não

neoplásico, negatividade para HIF-1 α é esperada (57,126). No entanto, DBNN apresentou marcação citoplasmática de HIF-1 α em todas as amostras.

Por outro lado, embora HIF-1 α seja raramente encontrado em tecidos saudáveis, um estudo mostrou expressão citoplasmática e nuclear de HIF-1 α mais aumentada em tecidos normais de vesícula biliar do que em tecidos tumorais, além de sugerir que essa proteína desempenha papéis diferentes na angiogênese desses dois tipos de tecido (127). Além disso, há referência de expressão aumentada de HIF-1 α em ratos que desenvolveram colelitíase (128). As amostras analisadas em nosso estudo foram coletadas durante colecistectomia videolaparoscópica, o que poderia explicar a marcação de HIF-1 α em amostras de ductos biliares coletados.

Neste estudo, realizamos correlação entre as expressões dos biomarcadores para avaliar e confirmar suas interações já estabelecidas. As expressões gênicas de *SMAD4* e *TGFB1* se correlacionaram positivamente em ACDP e CCA, o que é esperado visto suas interações na via de sinalização e transdução de sinal (47,48,50,51). O mesmo ocorreu para *VEGFA* e *HIF1A* em todos os grupos, assim como *VEGFA* e *KDR* em ACDP e iCCA (53–55). No entanto, houve correlação positiva entre *PIK3CA* e *PTEN* em eCCA e iCCA. Devido ao papel que PTEN tem como regulador negativo de *PIK3CA* e sua proteína, esperávamos encontrar correlação negativa entre esses genes. Existem referências à diversos mecanismos que podem atuar no aumento da expressão de PTEN, como a subexpressão de ASR2 (proteína 2 de resistência ao arsênio) e redução na expressão de miR-21 (129), assim como fatores de transcrição, modificações epigenéticas e estabilização da proteína de PTEN (130).

No que diz respeito à classificação tumoral por meio do potencial discriminatório das expressões dos biomarcadores; *TGFB1* mostrou os melhores valores para

diferenciação entre iCCA e ACDP. No entanto, estes dois tipos tumorais não representam o maior desafio no diagnóstico. Embora iCCA e eCCA sejam tumores distintos, a sobreposição tumoral entre eCCA e ACDP é mais complexa (18). Nesse contexto, os valores de expressão gênica para todos os biomarcadores não se mostraram clinicamente relevantes para distinguir entre eCCA e ACDP, ao contrário das expressões proteicas de SMAD4 e TGF- β 1, com valores clinicamente satisfatórios para esta diferenciação.

A partir de nossos resultados, podemos afirmar que 90% das amostras de câncer biliopancreático na região de sobreposição de ACDP e eCCA com valores de expressão de SMAD4 acima de 0,96 serão classificadas corretamente como eCCA. As demais serão erroneamente classificadas como eCCA, quando na realidade serão amostras de ACDP. O mesmo padrão se repete para TGF- β 1, em que 90% das amostras com expressão abaixo de 2,41 serão corretamente classificadas como eCCA. Embora os valores sejam satisfatórios, o tamanho amostral deste estudo é limitante. Estudos com número maior de amostras poderão explorar de forma mais abrangente a via TGF- β /SMAD4 de sinalização e transdução de sinal no diagnóstico diferencial entre ACDP e CCA, especialmente, o subtipo extra-hepático.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

1. Os genes *PIK3CA*, *PTEN*, *SMAD4*, *TGFB1*, *VEGFA* e *KDR* são superexpressos em ACDP, eCCA e iCCA de forma heterogênea. O subtipo tumoral iCCA se diferencia de ACDP pela superexpressão gênica de *HIF1A*, *VEGFA*, *KDR*, assim como de *TGFB1* que também o distingue de eCAA. Estes resultados revelam a heterogeneidade molecular entre os tipos tumorais e podem contribuir para futuras estratégias terapêuticas e perspectivas de prognóstico.

2. Em eCCA, a marcação das proteínas PTEN, com predomínio de negatividade, SMAD4 com destaque para a marcação citoplasmática e TGF- β 1 com marcação nuclear confere distinção, favorecendo a diferenciação com ACDP. Além disso, a co-expressão difusa e nuclear de VEGF-A detectada apenas nos subtipos iCCA e eCCA, e a co-expressão difusa e citoplasmática exclusiva em ACDP, são características que poderão distinguir CCA e ACDP. Em iCCA, o padrão distinto de marcação de HIF-1 α pode contribuir para o diagnóstico diferencial dessas neoplasias biliopancreáticas.

3. Em iCCA características anatomopatológicas (tumores moderadamente ou pouco diferenciados, estágios mais avançados, invasão vascular linfática ou perineural), associam-se a expressão gênica elevada de *TGFB1*, *VEGFA* e *KDR*, comparado a ACDP; enquanto *HIF1A* e *KDR*, com maior expressão, se apresentam como possíveis marcadores prognósticos para iCCA pouco diferenciado. Para ACDP, o estágio avançado associa-se a maior expressão proteica de VEGFR2, comparado a eCCA, e o aumento da expressão proteica de TGF- β 1 com invasão perineural e metástase. A intensa expressão citoplasmática de TGF- β 1 pode caracterizar ACDP moderadamente diferenciado.

4. As expressões proteicas de TGF- β 1 e SMAD4 são promissoras na diferenciação entre ACDP e eCCA, destacando estas proteínas como potenciais marcadores diagnósticos para estas doenças.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nakanuma Y, Sato Y. Hilar cholangiocarcinoma is pathologically similar to pancreatic duct adenocarcinoma: suggestions of similar background and development. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2014 Jul;21(7):441–7.
2. Nakanuma Y, Hosoi M, Sanzen T, Sasaki M. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech*. 1997 Sep 15;38(6):552–70.
3. Elias H, Sherrick J. Morphology of the Liver. *Ann Intern Med*. 1970 Feb 1;72(2):296.
4. Sternlieb I, Quintana N. Biliary proteins and ductular ultrastructure. *Hepatology*. 1985 Jan;5(1):139–43.
5. Pansky B. Anatomy of the pancreas. *International journal of pancreatology*. 1990 Aug;7(1–3):101–8.
6. Gkoutakos A, Martelli FM, Silvestris N, Bevere M, De Bellis M, Alaimo L, et al. Extrahepatic Distal Cholangiocarcinoma vs. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Histology and Molecular Profiling for Differential Diagnosis and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2023 Feb 24;15(5):1454.
7. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. Vol. 17, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Research; 2020. p. 557–88.
8. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marziani M, Andersen JB, Invernizzi P, et al. Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus

- statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 May 20;13(5):261–80.
9. Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma — evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Feb 10;15(2):95–111.
 10. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, et al. Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 May 20;13(5):261–80.
 11. Forner A, Vidili G, Rengo M, Bujanda L, Ponz-Sarvisé M, Lamarca A. Clinical presentation, diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Liver International*. 2019 May 25;39(S1):98–107.
 12. Alvaro D, Bragazzi MC, Benedetti A, Fabris L, Fava G, Invernizzi P, et al. Cholangiocarcinoma in Italy: A national survey on clinical characteristics, diagnostic modalities and treatment. Results from the “Cholangiocarcinoma” committee of the Italian Association for the Study of Liver disease. *Digestive and Liver Disease*. 2011 Jan;43(1):60–5.
 13. Sirica AE, Gores GJ. Desmoplastic stroma and cholangiocarcinoma: Clinical implications and therapeutic targeting. *Hepatology*. 2014 Jun;59(6):2397–402.
 14. Tamma R, Annese T, Ruggieri S, Brunetti O, Longo V, Cascardi E, et al. Inflammatory cells infiltrate and angiogenesis in locally advanced and metastatic cholangiocarcinoma. *Eur J Clin Invest*. 2019 May 3;49(5).

15. Lorenzini S, Bird TG, Boulter L, Bellamy C, Samuel K, Aucott R, et al. Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut*. 2010 May 1;59(5):645–54.
16. Kendall T, Verheij J, Gaudio E, Evert M, Guido M, Goeppert B, et al. Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. *Liver International*. 2019 May 20;39(S1):7–18.
17. Elvevi A, Laffusa A, Scaravaglio M, Rossi RE, Longarini R, Stagno AM, et al. Clinical treatment of cholangiocarcinoma: an updated comprehensive review. *Ann Hepatol*. 2022 Sep;27(5):100737.
18. Ethun CG, Lopez-Aguilar AG, Pawlik TM, Poultsides G, Idrees K, Fields RC, et al. Distal Cholangiocarcinoma and Pancreas Adenocarcinoma: Are They Really the Same Disease? A 13-Institution Study from the US Extrahepatic Biliary Malignancy Consortium and the Central Pancreas Consortium. *J Am Coll Surg*. 2017 Apr;224(4):406–13.
19. Hu JX, Zhao CF, Chen WB, Liu QC, Li QW, Lin YY, et al. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World J Gastroenterol*. 2021 Jul 21;27(27):4298–321.
20. Ren B, Liu X, Suriawinata AA. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions. *Am J Pathol*. 2019 Jan;189(1):9–21.
21. BARBOSA IR, SANTOS CA dos, SOUZA DLB de. PANCREATIC CANCER IN BRAZIL: MORTALITY TRENDS AND PROJECTIONS UNTIL 2029. *Arq Gastroenterol*. 2018 Sep;55(3):230–6.

22. Hessmann E, Buchholz SM, Demir IE, Singh SK, Gress TM, Ellenrieder V, et al. Microenvironmental Determinants of Pancreatic Cancer. *Physiol Rev.* 2020 Oct 1;100(4):1707–51.
23. Byeon S, du Toit-Thompson T, Gillson J, Gill AJ, Samra JS, Mittal A, et al. Heterogeneous tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: An emerging role of single-cell analysis. *Cancer Med.* 2023 Sep 3;12(17):18020–31.
24. Takenami T, Maeda S, Karasawa H, Suzuki T, Furukawa T, Morikawa T, et al. Novel biomarkers distinguishing pancreatic head Cancer from distal cholangiocarcinoma based on proteomic analysis. *BMC Cancer.* 2019 Dec 5;19(1):318.
25. Schmuck RB, de Carvalho-Fischer C V., Neumann C, Pratschke J, Bahra M. Distal bile duct carcinomas and pancreatic ductal adenocarcinomas: postulating a common tumor entity. *Cancer Med.* 2016 Jan 9;5(1):88–99.
26. Goonetilleke KS, Siriwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO).* 2007 Apr;33(3):266–70.
27. Kim S, Park BK, Seo JH, Choi J, Choi JW, Lee CK, et al. Carbohydrate antigen 19-9 elevation without evidence of malignant or pancreatobiliary diseases. *Sci Rep.* 2020 Jun 1;10(1):8820.
28. Macias RIR, Muñoz-Bellvís L, Sánchez-Martín A, Arretxe E, Martínez-Arranz I, Lapitz A, et al. A Novel Serum Metabolomic Profile for the Differential Diagnosis of Distal Cholangiocarcinoma and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers (Basel).* 2020 May 31;12(6):1433.

29. Marrelli D, Caruso S, Pedrazzani C, Neri A, Fernandes E, Marini M, et al. CA19-9 serum levels in obstructive jaundice: clinical value in benign and malignant conditions. *The American Journal of Surgery*. 2009 Sep;198(3):333–9.
30. Byrling J, Hilmersson KS, Ansari D, Andersson R, Andersson B. Thrombospondin-2 as a diagnostic biomarker for distal cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical and Translational Oncology*. 2022 Feb 28;24(2):297–304.
31. Fadahunsi OO, Ibitoye BO, Adisa AO, Alatise OI, Adetiloye VA, Idowu BM. Diagnostic accuracy of ultrasonography in adults with obstructive jaundice. *J Ultrason*. 2020 Jun 15;20(81):e100–5.
32. Duval J V., Savas L, Banner BF. Expression of Cytokeratins 7 and 20 in Carcinomas of the Extrahepatic Biliary Tract, Pancreas, and Gallbladder. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Aug 1;124(8):1196–200.
33. Gerber TS, Goeppert B, Hausen A, Witzel HR, Bartsch F, Schindeldecker M, et al. N-Cadherin Distinguishes Intrahepatic Cholangiocarcinoma from Liver Metastases of Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 23;14(13):3091.
34. Hooper JE, Morgan TK, Grompe M, Sheppard BC, Troxell ML, Corless CL, et al. The novel monoclonal antibody HPC2 and N-cadherin distinguish pancreatic ductal adenocarcinoma from cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2012 Oct;43(10):1583–9.
35. Lok T, Chen L, Lin F, Wang HL. Immunohistochemical distinction between intrahepatic cholangiocarcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2014 Feb;45(2):394–400.

36. Kälisch J, Padden J, Bertram S, Pott LL, Reis H, Westerwick D, et al. Annexin A10 optimally differentiates between intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatic metastases of pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemical markers and panels. *Virchows Archiv*. 2017 May 29;470(5):537–43.
37. Geramizadeh B, Sehat M, Mehrmozayan A, Ali Reza AR. Annexin Expression in Cholangiocarcinoma, and Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma “Is it be Helpful for Differential Diagnosis of These Tumors in the Liver?”. *Iran J Pathol*. 2021;16(4):433–8.
38. Fernández Moro C, Fernandez-Woodbridge A, Alistair D’souza M, Zhang Q, Bozoky B, Kandaswamy SV, et al. Immunohistochemical Typing of Adenocarcinomas of the Pancreatobiliary System Improves Diagnosis and Prognostic Stratification. *PLoS One*. 2016 Nov 9;11(11):e0166067.
39. Fabris L, Sato K, Alpini G, Strazzabosco M. The Tumor Microenvironment in Cholangiocarcinoma Progression. *Hepatology*. 2021 Jan 22;73(S1):75–85.
40. Arafeh R, Samuels Y. PIK3CA in cancer: The past 30 years. *Semin Cancer Biol*. 2019 Dec;59:36–49.
41. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 2017 Aug;170(4):605–35.
42. Viaud J, Mansour R, Antkowiak A, Mujalli A, Valet C, Chicanne G, et al. Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie*. 2016 Jun;125:250–8.
43. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci*. 2014 Mar 1;127(5):923–8.

44. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SAG. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF- κ B and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 2004 Nov 11;23(53):8571–80.
45. Buchanan CM, Dickson JMJ, Lee WJ, Guthridge MA, Kendall JD, Shepherd PR. Oncogenic Mutations of p110 α Isoform of PI 3-Kinase Upregulate Its Protein Kinase Activity. *PLoS One*. 2013 Aug 1;8(8):e71337.
46. Baer R, Cintas C, Dufresne M, Cassant-Sourdy S, Schönhuber N, Planque L, et al. Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110 α . *Genes Dev*. 2014 Dec 1;28(23):2621–35.
47. Dardare J, Witz A, Merlin JL, Gilson P, Harlé A. SMAD4 and the TGF β Pathway in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020 May 16;21(10):3534.
48. Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci*. 2018;14(2):111–23.
49. Park H, Bang J, Nam A, Park JE, Jin MH, Bang Y, et al. The prognostic role of soluble TGF-beta and its dynamics in unresectable pancreatic cancer treated with chemotherapy. *Cancer Med*. 2020 Jan 7;9(1):43–51.
50. Bakin A V., Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor β -mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Nov;275(47):36803–10.

51. Hata A, Chen YG. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Sep;8(9):a022061.
52. Song K, Wang H, Krebs TL, Danielpour D. Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF- β /ALK5-mediated Smad3 activation. EMBO J. 2006 Jan 11;25(1):58–69.
53. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. Cell. 2019 Mar;176(6):1248–64.
54. Claesson-Welsh L, Welsh M. <scp>VEGFA</scp> and tumour angiogenesis. J Intern Med. 2013 Feb 19;273(2):114–27.
55. Fontemaggi G. Non-coding <scp>RNA</scp> regulatory networks in post-transcriptional regulation of <scp>VEGFA</scp> in cancer. IUBMB Life. 2023 Jan 10;75(1):30–9.
56. Korc M. Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. Mol Cancer. 2003;2(1):8.
57. Rashid M, Zadeh LR, Baradaran B, Molavi O, Ghesmati Z, Sabzichi M, et al. Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. Gene. 2021 Sep;798:145796.
58. Jin X, Dai L, Ma Y, Wang J, Liu Z. Implications of HIF-1 α in the tumorigenesis and progression of pancreatic cancer. Cancer Cell Int. 2020 Dec 24;20(1):273.
59. Thongchot S, Yongvanit P, Loilome W, Seubwai W, Phunicom K, Tassaneeyakul W, et al. High Expression of HIF-1 α , BNIP3 and PI3KC3: Hypoxia-Induced Autophagy Predicts Cholangiocarcinoma Survival and Metastasis. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2014 Jul 30;15(14):5873–8.
60. Tang J, Tang R, Gu P, Han J, Huang W, Xue F. Hsa_circ_0019054 up-regulates HIF1A through sequestering miR-340–5p to promote the tumorigenesis of

- intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hum Exp Toxicol*. 2022 Jan 6;41:096032712211264.
61. Möbius C, Demuth C, Aigner T, Wiedmann M, Wittekind C, Mössner J, et al. Evaluation of VEGF A expression and microvascular density as prognostic factors in extrahepatic cholangiocarcinoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2007 Oct;33(8):1025–9.
 62. Leppänen J, Helminen O, Huhta H, Kauppila JH, Isohookana J, Haapasaari KM, et al. Weak HIF-1alpha expression indicates poor prognosis in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J Surg Oncol*. 2018 Dec 4;16(1):127.
 63. Tocris Bioscience. News-Medical.net. 2019. p. 1–7 Researching Angiogenesis in Cancer.
 64. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
 65. Pontén F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas—a tool for pathology. *J Pathol*. 2008 Dec 13;216(4):387–93.
 66. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul 28;9(7):671–5.
 67. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLoS One*. 2014 May 6;9(5):e96801.
 68. Jensen K, Krusenstjerna-Hafstrøm R, Lohse J, Petersen KH, Derand H. A novel quantitative immunohistochemistry method for precise protein measurements

- directly in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: analytical performance measuring HER2. *Modern Pathology*. 2017 Feb;30(2):180–93.
69. Andrews M, Roeser J. *psyntax: Helper Tools for Teaching Statistical Data Analysis*. 2021.
 70. Fox J, Weisberg S. *An R Companion to Applied Regression*. 2020.
 71. Dinno A. *dunn.test: Dunn’s Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums*. 2017.
 72. Behrendt S. *lm.beta: Add Standardized Regression Coefficients to Linear-Model-Objects*. 2023.
 73. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, et al. *pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves*. *BMC Bioinformatics*. 2011 Dec 17;12(1):77.
 74. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2023.
 75. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development for R*. 2020.
 76. Lemon J. *Plotrix: a package in the red-light district of R*. 2006.
 77. Heinzen E, Sinnwell J, Atkinson E, Gunderson T, Dougherty G, Votruba P, et al. *arsenal: An Arsenal of “R” Functions for Large-Scale Statistical Summaries*. 2021.
 78. Chang W. *extrafont: Tools for Using Fonts*. 2023.
 79. Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D, Posit Software. *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. 2023.
 80. Wickham H. *ggplot2*. Cham: Springer International Publishing; 2016.
 81. Kassambara A. *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots*. 2023.

82. Thibault B, Ramos-Delgado F, Pons-Tostivint E, Therville N, Cintas C, Arcucci S, et al. Pancreatic cancer intrinsic PI3K α activity accelerates metastasis and rewires macrophage component. *EMBO Mol Med*. 2021 Jul 7;13(7).
83. Li X, Tao J, Cigliano A, Sini M, Calderaro J, Azoulay D, et al. Co-activation of PIK3CA and Yap promotes development of hepatocellular and cholangiocellular tumors in mouse and human liver. *Oncotarget*. 2015 Apr 30;6(12):10102–15.
84. Baer R, Cintas C, Dufresne M, Cassant-Sourdy S, Schönhuber N, Planque L, et al. Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110 α . *Genes Dev*. 2014 Dec 1;28(23):2621–35.
85. Yap TA, Yan L, Patnaik A, Fearen I, Olmos D, Papadopoulos K, et al. First-in-Man Clinical Trial of the Oral Pan-AKT Inhibitor MK-2206 in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Dec 10;29(35):4688–95.
86. Payne SN, Maher ME, Tran NH, Van De Hey DR, Foley TM, Yueh AE, et al. PIK3CA mutations can initiate pancreatic tumorigenesis and are targetable with PI3K inhibitors. *Oncogenesis*. 2015 Oct 5;4(10):e169–e169.
87. Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shiota T, Elzawahry A, Kato M, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet*. 2015 Sep 10;47(9):1003–10.
88. Deng G, Zhu L, Huang F, Nie W, Huang W, Xu H, et al. Knockdown of Sall4 inhibits intrahepatic cholangiocarcinoma cell migration and invasion in ICC-9810 cells. *Onco Targets Ther*. 2016 Aug;Volume 9:5297–305.

89. Zhang Q, Li X, Li Y, Chen S, Shen X, Dong X, et al. Expression of the PTEN/FOXO3a/PLZF signalling pathway in pancreatic cancer and its significance in tumourigenesis and progression. *Invest New Drugs*. 2020 Apr 14;38(2):321–8.
90. Nepal C, O'Rourke CJ, Oliveira DVNP, Taranta A, Shema S, Gautam P, et al. Genomic perturbations reveal distinct regulatory networks in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology*. 2018 Sep 12;68(3):949–63.
91. Ebert MPA, Fei G, Schandl L, Mawrin C, Dietzmann K, Herrera P, et al. Reduced PTEN expression in the pancreas overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Br J Cancer*. 2002 Jan 8;86(2):257–62.
92. Yang J, Zou Y, Jiang D. Honokiol suppresses proliferation and induces apoptosis via regulation of the miR-21/PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in human osteosarcoma cells. *Int J Mol Med*. 2018 Jan 29;
93. Li J, Yao L, Li G, Ma D, Sun C, Gao S, et al. miR-221 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition through Targeting PTEN and Forms a Positive Feedback Loop with β -catenin/c-Jun Signaling Pathway in Extra-Hepatic Cholangiocarcinoma. *PLoS One*. 2015 Oct 26;10(10):e0141168.
94. Lv X, Li J, Yang B. Clinical effects of miR-101 on prognosis of hepatocellular carcinoma and carcinogenic mechanism of anti-miR-101. *Oncol Rep*. 2016 Oct;36(4):2184–92.
95. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*. 2003 Jun;113(6):685–700.
96. Connolly EC, Freimuth J, Akhurst RJ. Complexities of TGF- β Targeted Cancer Therapy. *Int J Biol Sci*. 2012;8(7):964–78.

97. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*. 2000 Oct;103(2):295–309.
98. Brader S, Eccles SA. Phosphoinositide 3-Kinase Signalling Pathways in Tumor Progression, Invasion and Angiogenesis. *Tumori Journal*. 2004 Jan 23;90(1):2–8.
99. Croce CM. Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008 Jan 31;358(5):502–11.
100. Kubiczкова L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF- β – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*. 2012 Dec 3;10(1):183.
101. Hua Z. Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2003;9(12):2764.
102. Torbenson M, Marinopoulos S, Dang DT, Choti M, Ashfaq R, Maitra A, et al. Smad4 overexpression in hepatocellular carcinoma is strongly associated with transforming growth factor beta II receptor immunolabeling. *Hum Pathol*. 2002 Sep;33(9):871–6.
103. Lin Z, Zhang L, Zhou J, Zheng J. Silencing Smad4 attenuates sensitivity of colorectal cancer cells to cetuximab by promoting epithelial-mesenchymal transition. *Mol Med Rep*. 2019 Aug 21;
104. Ali S, Cohen C, Little J V., Sequeira JH, Mosunjac MB, Siddiqui MT. The utility of SMAD4 as a diagnostic immunohistochemical marker for pancreatic adenocarcinoma, and its expression in other solid tumors. *Diagn Cytopathol*. 2007 Oct 13;35(10):644–8.
105. Glazer ES, Welsh E, Pimiento JM, Teer JK, Malafa MP. *TGF β 1* overexpression is associated with improved survival and low tumor cell proliferation in patients with

- early-stage pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017 Jan 3;8(1):999–1006.
106. Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. 2024.
 107. Chen Y, Ma L, He Q, Zhang S, Zhang C, Jia W. TGF- β 1 expression is associated with invasion and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Biol Res*. 2015 Dec 21;48(1):26.
 108. Dardare J, Witz A, Merlin JL, Gilson P, Harlé A. SMAD4 and the TGF β Pathway in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci*. 2020 May 16;21(10):3534.
 109. Eviston TJ, Minaei E, Mueller SA, Ahmadi N, Ashford B, Clark JR, et al. Gene expression profiling of perineural invasion in head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2021 Jun 23;11(1):13192.
 110. Virtanen S, Alarmo EL, Sandström S, Ampuja M, Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein -4 and -5 in pancreatic cancer—Novel bidirectional players. *Exp Cell Res*. 2011 Sep;317(15):2136–46.
 111. Shimizu T. Effect of transforming growth factor- β 1 on human intrahepatic cholangiocarcinoma cell growth. *World J Gastroenterol*. 2006;12(39):6316.
 112. Cuzziol CI, Castanhole-Nunes MMU, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. MicroRNAs as regulators of VEGFA and NFE2L2 in cancer. *Gene*. 2020 Oct;759:144994.
 113. Dibbens JA, Miller DL, Damert A, Risau W, Vadas MA, Goodall GJ. Hypoxic Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stability Requires the Cooperation of Multiple RNA Elements. *Mol Biol Cell*. 1999 Apr;10(4):907–19.

114. Li Y, Zhao L, Li XF. Hypoxia and the Tumor Microenvironment. *Technol Cancer Res Treat*. 2021 Jan 1;20:153303382110363.
115. Lim YJ, Lee JK, Park CK, Song SY, Jang WY, Ha HY, et al. Prognostic Value of VEGF in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Korean J Intern Med*. 2004 Mar 31;19(1):10–4.
116. Goldberg-Cohen I, Furneauxb H, Levy AP. A 40-bp RNA Element That Mediates Stabilization of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA by HuR. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Apr;277(16):13635–40.
117. Lejbkowicz F, Goldberg-Cohen I, Levy AP. New horizons for VEGF. Is there a role for nuclear localization? *Acta Histochem*. 2005 Feb;106(6):405–11.
118. Guedj N, Zhan Q, Perigny M, Rautou PE, Degos F, Belghiti J, et al. Comparative protein expression profiles of hilar and peripheral hepatic cholangiocarcinomas. *J Hepatol*. 2009 Jul;51(1):93–101.
119. Möbius C, Demuth C, Aigner T, Wiedmann M, Wittekind C, Mössner J, et al. Evaluation of VEGF A expression and microvascular density as prognostic factors in extrahepatic cholangiocarcinoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2007 Oct;33(8):1025–9.
120. Peng H, Zhang Q, Li J, Zhang N, Hua Y, Xu L, et al. Apatinib inhibits VEGF signaling and promotes apoptosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):17220–9.
121. Peng T, Deng X, Tian F, Li Z, Jiang P, Zhao X, et al. The interaction of LOXL2 with GATA6 induces VEGFA expression and angiogenesis in cholangiocarcinoma. *Int J Oncol*. 2019 Jul 15;

122. Li W, Keller GA. VEGF nuclear accumulation correlates with phenotypical changes in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000 May 1;113(9):1525–34.
123. Domingues I, Rino J, Demmers JAA, de Lanerolle P, Santos SCR. VEGFR2 Translocates to the Nucleus to Regulate Its Own Transcription. *PLoS One.* 2011 Sep 28;6(9):e25668.
124. Qian Y, Yao W, Yang T, Yang Y, Liu Y, Shen Q, et al. aPKC- ι /P-Sp1/Snail signaling induces epithelial–mesenchymal transition and immunosuppression in cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2017 Oct 30;66(4):1165–82.
125. Mariotti V, Fiorotto R, Cadamuro M, Fabris L, Strazzabosco M. New insights on the role of vascular endothelial growth factor in biliary pathophysiology. *JHEP Reports.* 2021 Jun;3(3):100251.
126. Cowman SJ, Koh MY. Revisiting the HIF switch in the tumor and its immune microenvironment. *Trends Cancer.* 2022 Jan;8(1):28–42.
127. Wu Y, Meng D, You Y, Sun R, Fu M, Yan Q, et al. Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1A) plays different roles in Gallbladder Cancer and Normal Gallbladder Tissues. *J Cancer.* 2021;12(3):827–39.
128. Asai Y, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Maekawa M, Honma M, et al. Activation of the Hypoxia Inducible Factor 1 α Subunit Pathway in Steatotic Liver Contributes to Formation of Cholesterol Gallstones. *Gastroenterology.* 2017 May;152(6):1521-1535.e8.
129. He Q, Cai L, Shuai L, Li D, Wang C, Liu Y, et al. Ars2 is overexpressed in human cholangiocarcinomas and its depletion increases PTEN and PDCD4 by decreasing microRNA-21. *Mol Carcinog.* 2013 Apr 28;52(4):286–96.

130. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 May 4;13(5):283–96.

Anexos

