

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”



**Identificação de biomarcadores relacionados com a eficácia do tratamento
radioterápico no câncer de pâncreas**

Laíza Brugnerotto

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Universidade Estadual
Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus
de Botucatu, para a obtenção do título de Bacharel em
Física Médica.*

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Docente do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Setor de Morfologia

**Botucatu
2022**

Laíza Brugnerotto

Identificação de biomarcadores relacionados com
a eficácia do tratamento radioterápico no câncer
de pâncreas

*Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel
em Física Médica.*

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Brugnerotto, Laíza.

Identificação de biomarcadores relacionados com a
eficácia do tratamento radioterápico no câncer de pâncreas
/ Laíza Brugnerotto. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física
Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Flávia Karina Delella
Capes: 10303030

1. Biologia computacional. 2. Marcadores bioquímicos.
3. Neoplasias pancreáticas. 4. Radioterapia. 5.
Proteômica.

Palavras-chave: Bioinformática; Biomarcador; Câncer de
pâncreas; Radioterapia; Secretoma.

Laíza Brugnerotto

Identificação de biomarcadores relacionados com a eficácia do tratamento
radioterápico no câncer de pâncreas

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel
em Física Médica.

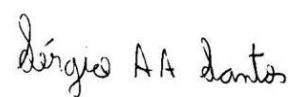
Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Comissão examinadora



Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Dr. Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Profa. Dra. Letícia Diniz Vieira

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, 09 de fevereiro de 2022

Agradecimentos

Agradeço a orientadora Profa. Dra. Flávia Karina Delella, pela oportunidade de realizar este trabalho e por todo esforço aplicado nele. Gostaria de agradecer também o mestrando Gabriel Henrique Caxali, que me auxiliou em todo o processo do TCC, desde a utilização das ferramentas online até em análises biológicas mais aprofundadas. Por fim, agradeço a minha família e meus amigos, que me apoiaram durante toda a graduação e me deram forças para concluir essa etapa tão importante da minha vida.

Resumo

O câncer de pâncreas (CP), mesmo sendo menos comum que os outros tipos da doença, é responsável por um dos maiores índices de mortalidade atualmente, com taxa de sobrevida global em cinco anos equivalente a apenas 7%. O CP acomete pessoas com idade entre 60 e 80 anos e é mais prevalente em homens. O adenocarcinoma ductal pancreático abrange a maior parte dos casos de CP e quando diagnosticado, apenas 20% dos pacientes apresentam o câncer limitado ao pâncreas, ao passo que 50% apresentam estágios de metástase. Isso ocorre devido a seu diagnóstico tardio, pois a maioria dos pacientes evidenciam os sinais das doenças em estágios mais avançados, o que dificulta os tratamentos utilizados, como a radioterapia, diminuindo a sobrevida. Por conta disso, destaca-se a importância de estudos como este, que visam a detecção de genes que possam se tornar possíveis biomarcadores desse tipo tumoral, principalmente em relação ao secretoma humano, por possibilitar analisar processos e vias responsáveis por migração tumoral, resistência a terapias e outros fatores importantes para a contenção da doença. Nesse cenário, o uso de ferramentas e plataformas online vem sendo ampliadas para a descoberta e validação desses biomarcadores, como uma forma mais econômica para explorar os estudos com câncer e aperfeiçoar o prognóstico da doença. Nosso estudo adaptou uma metodologia que propicia a identificação dos potenciais biomarcadores, onde encontramos vias inflamatórias relacionadas com a ativação do sistema complemento e vias referentes às atividades de receptores, que são responsáveis pela progressão tumoral e outros processos biológicos que contribuem para o desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: Câncer de pâncreas, secretoma, bioinformática, radioterapia, resistência, biomarcadores.

Abstract

Pancreatic cancer (PC), despite being less common than other types of the disease, is responsible for one of the highest mortality rates today, with an overall five-year survival rate equivalent to only 7%. PC affects people aged between 60 and 80 years and is more prevalent in men. Pancreatic ductal adenocarcinoma covers most cases of PC and when diagnosed, only 20% of patients have cancer limited to the pancreas, while 50% have stages of metastasis. This is due to its late diagnosis, as most patients show signs of diseases in more advanced stages, which makes the treatments used, such as radiotherapy, difficult, reducing survival. Because of this, the importance of studies such as this one, which aim to detect genes that may become possible biomarkers of this type of tumor, especially about the human secretome, is highlighted, as they allow the analysis of processes and pathways responsible for tumor migration, resistance to therapies and other important factors for disease containment. In this scenario, the use of online tools and platforms has been expanded for the discovery and validation of these biomarkers, as a more economical way to explore cancer studies and improve the prognosis of the disease. Our study adopted a methodology that allows the identification of potential biomarkers, where we found inflammatory pathways that are more predominantly enriched, related to the complement system and receptor activities, which are responsible for tumor progression and other biological processes that contribute to the development of the disease.

Keywords: Pancreatic cancer, secretome, bioinformatics, radiotherapy, resistance, biomarkers.

Sumário

1. Introdução.....	8
1.1. Câncer de pâncreas.....	8
1.2. Diagnóstico e tratamento.....	9
1.3. Predição de genes e uso de ferramentas de bioinformática na pesquisa do câncer.....	11
2. Justificativa e Hipótese.....	12
3. Objetivos.....	13
3.1. Objetivo Geral.....	13
3.2. Objetivos Específicos.....	13
4. Materiais e Métodos	13
4.1. Escolha do Secretoma de Referência.....	13
4.2. Download dos Dados com as Amostras Normais e Tumorais.....	13
4.3. Filtragem das Amostras Tumorais de Alta Pureza.....	14
4.4. Análise de Expressão Protéica Diferencial.....	14
4.5. Separação de Genes Diferencialmente Expressos relacionados a eficácia da radioterapia.....	14
4.6. Enriquecimento Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos Encontrados.....	15
5. Resultados	15
5.1. <i>Download</i> dos Dados com as Amostras Normais e Tumorais.....	15
5.2. Filtragem das Amostras Tumorais de Alta Pureza.....	15
5.4. Separação de Genes Diferencialmente Expressos relacionados a eficácia da radioterapia.....	16
5.5. Enriquecimento Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos Encontrados.....	18
6. Discussão	19
7. Conclusão	21
8. Referências Bibliográficas	22
9. Anexo	27

1. Introdução

1.1. Câncer de pâncreas.

O câncer é uma enfermidade que acomete grande parte da população em todo o mundo. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Silva (INCA), estima-se a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer por ano no período de 2020-2022 (SCHILITZ et al., 2019).

O câncer de pâncreas (CP) é pouco frequente em nosso país, representando apenas 2% de todos os tipos da afecção (INCA, 2020). Este tipo de câncer acomete pessoas com idade entre 60 e 80 anos e a incidência prevalece mais comum em homens, sendo 50% mais alta do que em mulheres (KAMISAWA et al., 2016). Algumas condições de riscos que se destacam são o aumento da idade, fumo, alto consumo de álcool, obesidade, diabetes mellitus, pancreatite crônica e fatores hereditários, como histórico de CP, câncer de ovário e câncer de mama (CAPASSO et al., 2018).

Apesar da baixa incidência, o CP é um dos cânceres com maior índice de mortalidade. Nos EUA, estudos indicam aproximadamente 60.430 novos casos, em ambos os sexos no ano de 2021, resultando em um total de 48.220 mortes (SIEGEL et al., 2021). A taxa de sobrevivência global em cinco anos é cerca de 7%; para pacientes submetidos à ressecção cirúrgica, este percentual passa a ser de 15-25% (KLEEFF et al., 2016). A baixa taxa de sobrevivência ocorre devido ao difícil diagnóstico precoce, pois a maioria dos pacientes são assintomáticos e só apresentam sinais da doença em estágios mais avançados (REN et al., 2018). Alguns dos sintomas aparentes nos estágios de evolução são dores nas costas, diarreia, dispepsia, náuseas, vômitos, perda de peso e início de diabetes (VAREEDAYAH; ALKADE; TAYLOR, 2018). Apenas 20% dos pacientes apresentam afecção limitada ao pâncreas (estágio 1 e 2), outros 30% encontram-se em estado localmente desenvolvido, onde o câncer possui ligação com a maior parte dos vasos vasculares (estágio 3), enquanto 50% são diagnosticados em metástase (estágio 4) (LOVEDAY et al., 2019).

Entre todos os tipos de CP, o mais comum é o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, do inglês *pancreatic ductal adenocarcinoma*), abrangendo aproximadamente 95% dos casos. É denominado como uma neoplasia infiltrativa com diferenciação glandular derivada da árvore ductal pancreática. Cerca de 60%-70% dos PDACs são encontrados na cabeça da glândula e os outros 30% no corpo e/ou cauda (por volta de 15% cada) (LUCHINI et al., 2016). Frequentes locais de metástases são manifestados por cadeias de nódulos linfáticos, podendo atingir estruturas como baço, estômago, glândula adrenal esquerda, peritônio e cólon

(LUCHINI; CAPELLI; SCARPA, 2016).

1.2. Diagnóstico e tratamento.

A ressecção cirúrgica permanece sendo o pilar curativo no tratamento do tumor pancreático, porém sua eficácia sozinha não é o suficiente para a supressão da doença, visto que mais de 90% dos pacientes recidivam ou morrem pela doença após o procedimento sem terapia adicional (NEOPTOLEMOS et al., 2018). Uma das alternativas descobertas para este problema é a combinação da quimioterapia adjuvante posteriormente à cirurgia. Neste tratamento, são comumente usados fármacos como a gencitabina, 5-fluorouracil e FOLFIRONOX (uma combinação de ácido folínico, 5-fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina) (NEOPTOLEMOS et al., 2018). Contudo, o PDAC possui predisposição a desenvolver quimiorresistência às drogas utilizadas, dificultando a ação da terapia e diminuindo a sua eficácia (SARVEPALLI et al., 2019). Fatores de transcrição, tais como enzimas e vias de sinalização envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, estão parcialmente ligados ao progresso de resistência (ZENG et al., 2019).

Neste caso, outro método indicado é a radioterapia (RT), que consiste na destruição ou diminuição do tumor por meio de radiações ionizantes. Na interação direta, os fótons de alta energia interagem com os elétrons, causando a danificação nas fitas do DNA das células cancerosas (SESHACHARYULU et al., 2017). Na interação indireta, ocorre o processo de radioiólise, quando a radiação interage com moléculas de água promovendo a formação de radicais livres, afetando o DNA ou proteínas (OKUNO, 2007). Além do feixe de fótons, outros tipos de radiação também são utilizados, como a radioterapia de partículas com nêutrons, prótons e íons de carbono (BYUN et al., 2021).

Normalmente a RT é administrada em conjunto com outras terapias, podendo ser utilizada com abordagem curativa com o intuito de erradicar os tumores, assim como de forma paliativa a fim de mitigar sintomas causados pelo câncer. Também pode ser executada como tratamento neoadjuvante para limitar ou diminuir o tamanho do tumor, tal como tratamento adjuvante para evitar a recidiva da doença (BLOY et al., 2014).

Geralmente, a dose recomendada na RT convencional (XRT) é de 45-54 Gray (Gy) em frações de 1,8 a 2 Gy, sendo 25-27 frações totais. Estes números podem variar caso a RT seja aplicada em conjunto com outros tratamentos (PALTA et al., 2019). Estudos com métodos radioterapêuticos mais tecnológicos possibilitaram grandes avanços na área da oncologia, apresentando novas técnicas mais aprimoradas em comparação com a RT convencional (BOUCHART et al., 2020).

A radioterapia estereotóxica corporal (SBRT, do inglês stereotactic body radiation therapy) possui um papel em evolução no tratamento neoadjuvante de pacientes com o tumor em estágio ressecável limítrofe. A SBRT usa altas doses de radiação por fração ($>5\text{Gy}$) em menos frações (de 1 a 5) para entregar doses focais e ablativas diretamente ao tumor, com o objetivo de diminuir a disseminação do tumor e permitir uma ressecção de margem negativa (quando não há células tumorais nas proximidades das bordas do tecido retirado) (ROBIN; GOODMAN, 2017).

A radioterapia modulada por intensidade (IMRT, do inglês intensity modulated radiotherapy) é um método que divide a radiação em pequenos feixes e os molda de acordo com o volume do tumor, a fim de proteger melhor os órgãos adjacentes (LANDAU; KALNICKI, 2018) (Figura 1, retirada de ROMEIJN et al., 2005). A dose total recomendada para essa técnica é de 50-54 Gy sendo 1,8 a 2 Gy por fração, podendo variar para doses mais altas (HUGUET et al., 2012). Um reforço integrado simultâneo (SIB) é frequentemente usado em combinação com a IMRT, pois consegue fornecer essas altas doses com mais segurança, obtendo resposta melhorada à radiação e evitando toxicidades significativas (DOBIASCH et al., 2018).

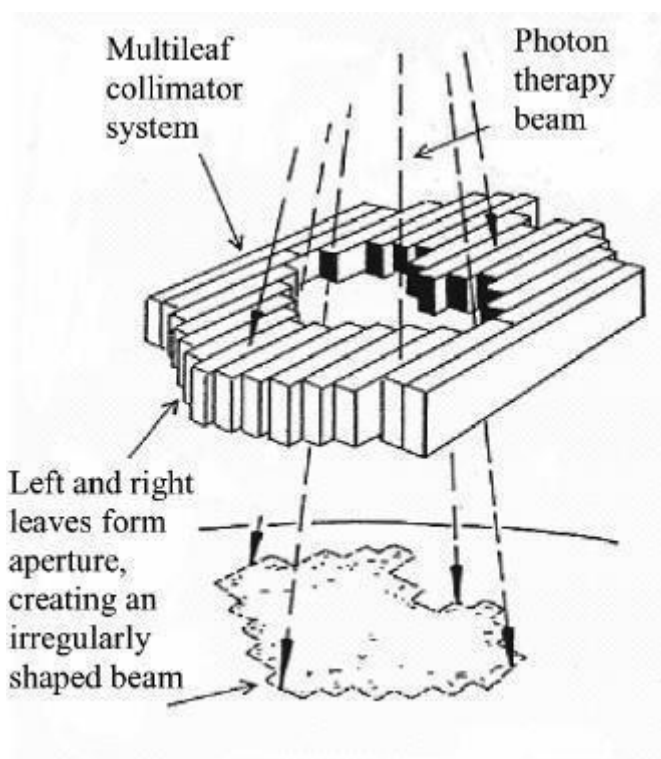


Figura 1: Colimador de múltiplas lâminas (MLC, do inglês multileaf collimator). Com o MLC equipado ao acelerador linear, é possível distribuir a dose de acordo com o tamanho do tumor, bloqueando parte dos feixes e limitando a dose de radiação entregue aos tecidos saudáveis (ROMEIJN et al., 2005).

Esses e outros métodos radioterápicos podem ser empregados em conjunto com a quimioterapia. A quimiorradioterapia (CRT) para PDAC ainda é muito incerta devido aos resultados conflitantes dos estudos relacionados à doença. Ainda que tenham sido obtidas boas respostas, nota-se uma considerável toxicidade e efeitos colaterais (LANDAU; KALNICKI, 2018). O quimioterápico gencitabina está sendo o mais relevante para essa combinação por ser um potente sensibilizador de radiação, apresentando eficácia sistêmica significativa e maior sobrevida em relação às outras drogas (LANDAU; KALNICKI, 2018).

Contudo, a maior parte dos tumores de CP são radorresistentes, sendo um dos principais motivos da inefetividade da RT. O PDAC é capaz de proporcionar a ativação de células estreladas, que produzem altas quantidades de proteínas da matriz extracelular (MEC), aumentando assim a rigidez em torno do câncer (fibrose extensa). Consequentemente, esta rigidez induz a criação de expansões heterogêneas de baixa concentração de oxigênio (hipóxia), fator que pode evitar a morte celular impelida por radiação (WISHART et al., 2021). Outras condições estão correlacionadas com a radorresistência, tais como alterações na resposta ao dano ao DNA, sistema de reparo do DNA e controle de ponto de verificação do ciclo celular (SESHACHARYULU et al., 2017). Devido a isso, destaca-se a importância de encontrar alternativas que busquem o aperfeiçoamento nos tratamentos de CP, a fim de melhorar a resposta à terapia e consequentemente a qualidade de vida dos pacientes.

1.3. Predição de genes e uso de ferramentas de bioinformática na pesquisa do câncer.

A utilização de possíveis biomarcadores ganhou grande atenção dos pesquisadores durante os últimos anos, pois estes auxiliam na detecção precoce da doença (diagnóstico), trazem melhorias no prognóstico e predizem a resposta do tumor a determinados tratamentos (FONG; WINTER, 2012). À vista disso, o secretoma vem sendo muito utilizado nos estudos desses marcadores, pois as moléculas desse conjunto são diretamente secretadas pelo tumor e a partir disso encontram-se circulantes no organismo, permitindo comunicação entre o tumor e seu microambiente (CAPECE et al., 2018). Esse grupo também permite a biopsia líquida, pois o princípio desse método é a busca de biomarcadores tumorais circulantes presentes no sangue e até mesmo na saliva, sendo considerado um exame menos invasivo comparado com a biópsia tradicional (CHEN; ZHAO, 2019). Alguns estudos recentes, como LV et al. (2019) e Oliveira et al. (2020), identificaram elementos significativos na progressão e no desenvolvimento de outras condições do PDAC e que são potenciais alvos para o tratamento, como genes e proteínas que participam na desregulação da matriz extracelular. Alguns tratamentos personalizados através da identificação de certos genes desempenham papéis

importantes neste cenário, visto que tais genes são capazes de indicar quais pacientes irão responder positivamente a certos tipos de terapia, possibilitando a aplicação de medicina personalizada de acordo com o perfil do indivíduo (WILLIAMS et al., 2010). Em conjunto com a predição de biomarcadores, está também o avanço no uso de ferramentas de bioinformática e servidores de web, uma vez que nestes estão armazenados dados ômicos (dados oriundos do genoma, transcriptoma, miRnoma, proteoma etc.) e diversos dados de diferentes amostras clínicas (ZHENG et al., 2020). Por conta disso, essas tecnologias acabam facilitando o processo de identificação de marcadores, tornando esta prática mais acessível e rápida, até mesmo para profissionais sem conhecimentos prévios em bioinformática (XIE et al., 2020).

Embora a descoberta tenha remodelado métodos como a quimioterapia, poucos biomarcadores estão acessíveis clinicamente para contribuir na otimização de tratamentos como radioterapia e quimiorradioterapia (DISCOVERY, 2020). À vista disso, é ideal identificar e analisar os genes diferencialmente expressos que sejam capazes de predizer a eficácia do tratamento radioterápico para CP.

2. Justificativa e Hipótese

Como citado anteriormente, o CP possui alto índice de mortalidade devido ao seu diagnóstico tardio, sendo detectado em estágios avançados da doença. Em razão disso, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de identificar possíveis biomarcadores que auxiliem na detecção precoce de tumores, propiciando melhor prognóstico e, consequentemente, tratamento mais positivo.

Neste contexto, a análise *in silico* vem ganhando destaque nos estudos com biomarcadores pela forma rápida e eficiente de adquirir dados sobre diferentes pacientes, como proteínas secretadas pelas células tumorais, através de plataformas de análise e servidores de banco de dados. Este âmbito da bioinformática é capaz de substituir testes *in vitro*, se adequando ao princípio de 3Rs de Russel e Burch (RUSSEL; BURCH, 1992), visando práticas de pesquisas mais econômicas e humanitárias (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Diante disso, espera-se identificar possíveis biomarcadores secretados propriamente pelas células tumorais pancreáticas, especificando os diferencialmente expressos após o tratamento de radioterapia para CP, com o propósito de analisar a efetividade do tratamento.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Esse estudo tem como objetivo geral identificar genes diferencialmente expressos que possam servir como biomarcadores para a eficácia do prognóstico e do tratamento radioterápico para o câncer de pâncreas.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar as amostras de tumores pancreáticos humanos presentes em bancos de dados, que apresentem alta pureza tumoral;
- Discernir dentre as proteínas secretadas, quais são originárias de genes diferencialmente expressos (DEGs), quando comparamos o tecido de pâncreas normal com o tecido tumoral;
- Observar as vias metabólicas que são influenciadas pelas proteínas diferencialmente expressas, buscando relacionar estas com processos fundamentais de progressão tumoral e resistência ao tratamento radioterápico;

4. Materiais e Métodos

4.1. Escolha do Secretoma de Referência

A lista com o secretoma utilizado como referência, foi obtida através do banco de dados *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>). Foi selecionada a lista com 1708 proteínas secretadas no sangue, pelo cérebro, no sistema digestório, nos sistemas reprodutores masculino e feminino, na matriz extracelular, em locais variados como olho ou pele e locais desconhecidos. Tal lista foi escolhida, pois exclui as proteínas que estão associadas a membrana ou em compartimentos intracelulares, como endossomos ou lisossomos, e assim enfatiza apenas proteínas que são de fato secretadas pelos diversos tipos celulares.

4.2. Download dos Dados com as Amostras Normais e Tumerais

Após obter a lista com 1708 proteínas, esta foi submetida a plataforma *Xena Browser* (<https://xenabrowser.net/>). Nesta, foram colocados como parâmetros estudos que contemplassem amostras de tecido normal, obtidas do GTEx (*Genotype Tissue Expression*), e de tumor primário de câncer de pâncreas do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Posteriormente foram selecionados os parâmetros: *Data type: Phenotypic*; *Phenotypic: sample type* e *primary site*. Enfim, foram aplicados os filtros para tumores primários de pâncreas. Após isso, a lista do

secretoma foi submetida à ferramenta, obtendo os dados do transcriptoma destas nas diferentes amostras encontradas nos demais bancos de dados. Os dados de expressão foram obtidos em *counts* (que é o valor bruto de expressão, sem aplicar normalização), e foram eliminadas amostras que não tinham expressão das proteínas listadas, ou que não representassem tumor primário e tecido normal.

4.3. Filtragem das Amostras Tumorais de Alta Pureza

As filtrações das amostras que apresentavam alta pureza foram realizadas de acordo com Benjamin J. Raphael et al., (2017), onde utilizaram o método do algoritmo *ABSOLUTE* para avaliação da pureza do tumor e estimaram uma mediana de 33% de variação. A lista com as amostras de alta pureza do tumor de pâncreas foi obtida no material complementar do artigo. Foram selecionadas as amostras com índice de pureza $\geq 33\%$, e posteriormente estas foram comparadas com a lista de amostras tumorais de ambos os tumores obtidos no *XENA*. As amostras presentes em ambas as listas foram selecionadas como amostras de alta pureza e foram utilizadas para análises posteriores.

4.4. Análise de Expressão Protéica Diferencial

Para determinar quais proteínas estavam alteradas no tecido tumoral em comparação ao normal, foi utilizada a ferramenta de análise estatística disponível no *Xena Browser*, a qual utiliza o método *Welch's test*. Os genes foram selecionados adotando um valor de $p < 0,01$. Considerou-se genes *up* regulados quando a média da expressão das amostras do TCGA foi maior que a média da expressão das amostras controle (GTEx), e *down* reguladas quando o oposto ocorreu.

4.5. Separação de Genes Diferencialmente Expressos relacionados a eficácia da radioterapia

Para a análise de expressão gênica de pacientes submetidos a radioterapia, utilizou-se o GEO (*Gene Expression Omnibus*). Os dados analisados foram retirados de dois estudos distintos disponíveis na plataforma GEO.

O primeiro estudo, Farren et al., 2020 (GSE129492), apresenta dados em *microarray*, sendo 24 *samples* de pacientes com CP submetidos a 4 tipos de tratamento: apenas ressecção cirúrgica (controle); quimioterapia; quimioterapia seguida de SBRT e quimioterapia seguida de

XRT, todos como terapias neoadjuvantes e com 6 pacientes cada. Foi feita a análise dos grupos de tratamentos presentes no estudo e posteriormente as amostras obtidas foram confrontadas com as amostras de CP do TCGA, obtidas anteriormente, que apresentavam genes *up* regulados.

O segundo estudo, Mills BN et al., 2022 (GSE185311), apresenta dados de RNAseq, sendo 22 *samples* de pacientes com CP, divididos em dois grupos: não tratados (13 *samples*) e tratados com radioterapia SBRT (9 *samples*). Para saber quais genes estavam *up* ou *down* regulados, foi feita a análise no programa R, através do pacote DESeq2, com p-valor < 0,05. Em ambos os estudos, os dados de expressão foram obtidos em *counts*.

4.6. Enriquecimento Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos Encontrados

Utilizou-se a plataforma *EnrichR* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) para determinar as vias e os processos biológicos influenciados pelos DEGs identificados anteriormente. Dentro desta, foram selecionados os seguintes bancos de dados para a análise: *WIKIPATHWAYS 2021 HUMAN*; *KEGG 2021 HUMAN*; *REACTOME 2021*; *NCI-NATURE 2021*; *GENE ONTOLOGY BIOLOGICAL PROCESS* e *GENE ONTOLOGY MOLECULAR FUNCION*. Com estes dados foi possível a identificação das vias metabólicas que sofriam influência dos DEGs identificados, além dos processos biológicos envolvidos. Foram realizadas análises para os genes *down* regulados. Os gráficos foram gerados de acordo com o valor de p < 0,05 e porcentagem de genes enriquecidos por termo.

5. Resultados

5.1. Download dos Dados com as Amostras Normais e Tumorais

Após a submissão das 1708 proteínas do secretoma na plataforma *Xena Browser*, obteve-se as planilhas referentes a tecido normal e tumoral de pâncreas. Assim, foram obtidas um total de 345 amostras, sendo 167 de tecido normal, pertencentes ao GTEx e 178 amostras de tecido tumoral primário, referentes ao banco de dados do TCGA.

5.2. Filtragem das Amostras Tumorais de Alta Pureza

Em seguida, foram determinadas as amostras tumorais que apresentavam alta pureza, ou seja, não continham muitos infiltrados de células inflamatórias. Assim, de acordo com Benjamin J. Raphael et al., (2017), foram encontradas 76 amostras de alta pureza tumoral de pâncreas.

5.3. Genes diferencialmente expresso das amostras de alta pureza

Através da ferramenta *Network Analyst*, foi possível analisar quais genes são diferencialmente expressos nas amostras do tipo tumoral estudado. Para um valor de p ajustado <0.01 , quando comparamos amostras de tecido normal com tumor primário de CP, foram encontrados 1422 genes significativos, dentre eles 651 *up* regulados e 287 *down* regulados.

5.4. Separação de Genes Diferencialmente Expressos relacionados a eficácia da radioterapia

No estudo de Farren et al., 2020 (GSE129492), após análise dos grupos definidos, foi possível identificar genes diferencialmente expressos em duas comparações de grupos:

→ Quimioterapia *versus* Quimioterapia seguida de XRT (figura 2);

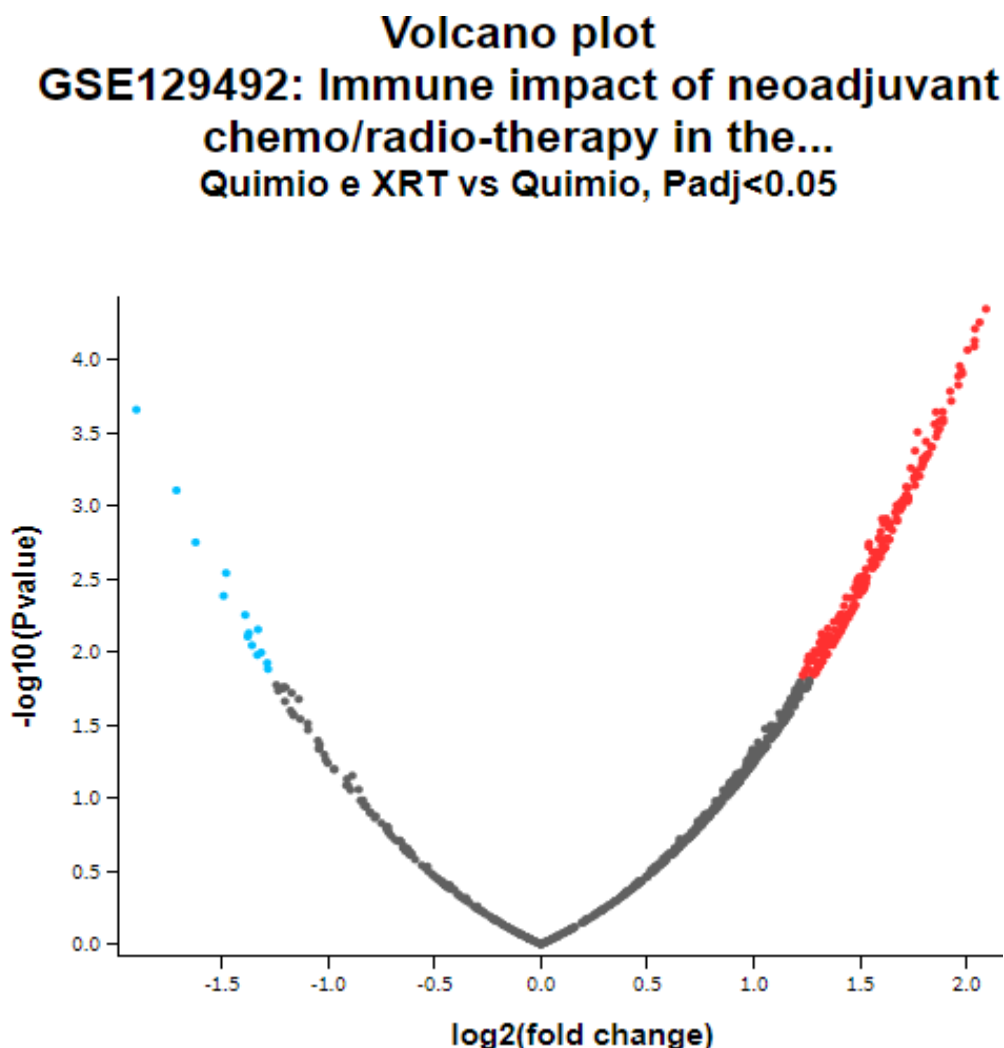


Figura 2: Gráfico *volcano plot* da expressão de genes significativos presentes nos tratamentos de quimioterapia e

quimioterapia seguida de XRT. Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul) (GEO, 2021).

→ Ressecção cirúrgica sem tratamento neoadjuvante (controle) *versus* Quimioterapia seguida de SBRT (figura 3).

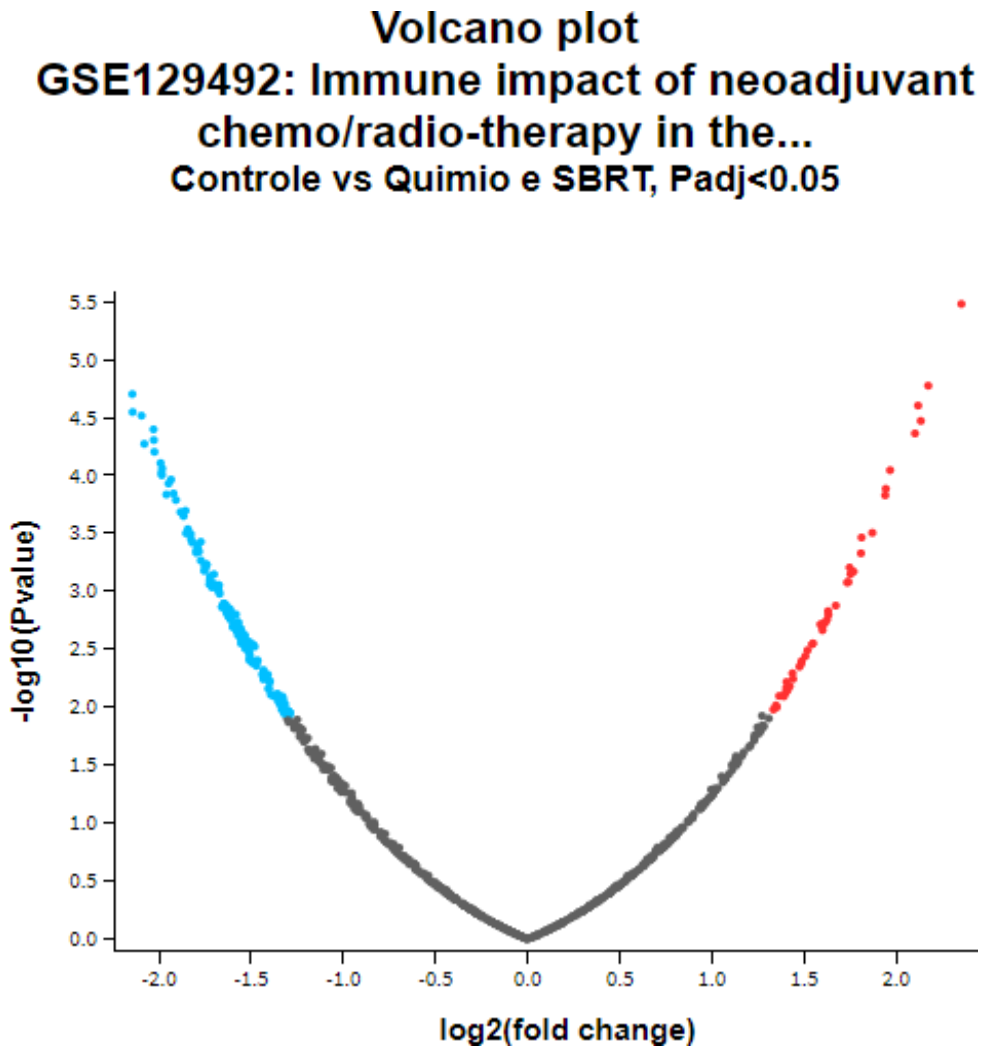


Figura 3: Gráfico *volcano plot* da expressão de genes significativos presentes nos tratamentos de ressecção cirúrgica (controle) e quimioterapia seguida de SBRT. Nota-se o maior número de genes *down* regulados (em azul) em relação ao genes *up* regulados (em vermelho) (GEO, 2021).

Quando confrontamos as amostras obtidas da comparação de Quimioterapia vs Quimioterapia seguida de XRT com as amostras de TCGA que estavam *up* reguladas, temos 42 genes significativos, sendo esses 42 expressos como *up* regulados. Com Controle vs Quimioterapia seguida de SBRT, obtivemos 21 genes significativos, sendo 2 genes *up* regulados e 19 *down* regulados.

No estudo Mills BN et al., 2022 (GSE185311), após análise com o DESeq2, encontrou-se 6 genes *down* regulados e nenhum *up* regulado quando comparamos o grupo de pacientes não tratados com tratados por SBRT (figura 4). Ao final, somando ambos os estudos, obteve-se uma lista com 25 genes *down* regulados com a técnica de radioterapia SBRT (tabela suplementar 1).

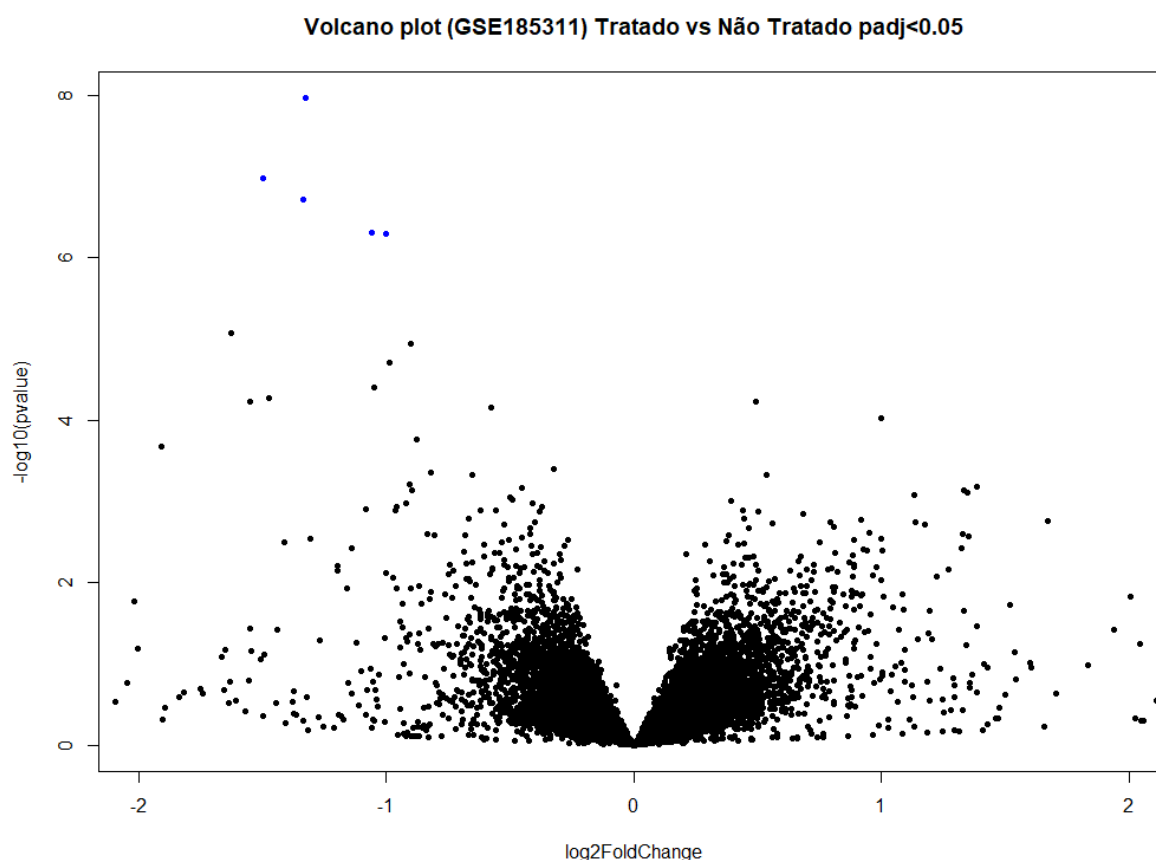


Figura 4: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos presentes nos grupos de pacientes tratados e não tratados com SBRT. Os 6 genes *down* regulados são representados pelos pontos em azul e os genes não significativos são representados em preto (Laíza, 2022).

5.5. Enriquecimento Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos Encontrados

Observando os 25 genes *down* regulados que foram enriquecidos, foi possível notar um grande enriquecimento das vias inflamatórias relacionadas com a ativação do sistema complemento e vias referentes às atividades de receptores. No banco de dados “*GO MOLECULAR FUNCTION*” os receptores encontrados estão associados com as moléculas BMP, TNF (fator de necrose tumoral) e receptor de sinalização de morte celular. Além desses, ficou enriquecido o termo “*transmembrane receptor protein serine/threonine kinase binding*”, estendendo nossa análise para inúmeros receptores que podem estar relacionados à progressão do CP. Já no enriquecimento realizado no “*REACTOME 2021*”, observou-se mais de uma via associada à ativação do sistema complemento do CP, além de vias relacionadas a degradação

de colágeno e modificação da MEC, demonstrando que a radioterapia auxiliou na diminuição da ocorrência desses processos.

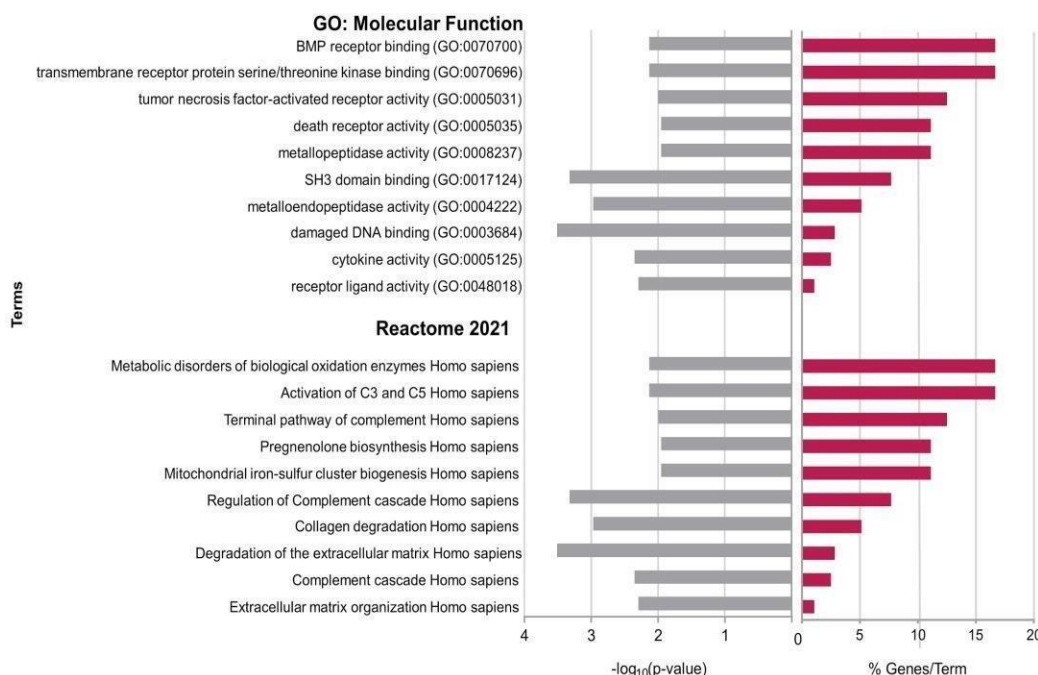


Figura 5: Gráfico de enriquecimento dos 25 genes *down* regulados, com as bases de dados GO: MOLECULAR FUNCTION e REACTOME 2021.

6. Discussão

Sabe-se que o CP possui alta taxa de mortalidade, devido principalmente a seu diagnóstico tardio, com cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com metástase (LOVEDAY et al., 2019). Por conta disso, a detecção de biomarcadores desse tipo tumoral vem sendo muito estudada no meio científico através de ferramentas *online*s, pois além de ser de fácil acesso e baixo custo, não é necessária a realização de exames invasivos nos pacientes (ZHENG et al., 2020). Entretanto, os estudos observados, enfatizam o tratamento quimioterápico, não se atentando à descoberta de biomarcadores radioterápicos. Isso é de suma importância, visto que o tratamento para CP pode ser realizado de maneira neoadjuvante, potencializando o tratamento quando a resposta à quimioterapia é baixa (HEINRICH, LANG, 2017). Com isso, nosso estudo visou na procura e identificação de DEGs que possam funcionar como potenciais biomarcadores para CP, focando em genes de proteínas secretadas pelo tumor e que podem ser detectadas no sangue.

Através das ferramentas utilizadas, foi possível identificar 25 genes que tiveram sua expressão diminuída pela técnica de radioterapia SBRT. Desses genes, dois (BMP6 e GDF15),

estão relacionados com os principais termos enriquecidos no banco de dados *GO MOLECULAR FUNCTION*. A família de genes BMP encontra-se subdividida em diversos grupos, sendo responsáveis por regular o desenvolvimento de vários tecidos, como cartilagem, ossos, cabelo, pele e tecido hematopoiético (MIYAZONO; KAMIYA; MORIKAWA, 2010). Os genes dessa família são classificados como transformadores do fator de crescimento tumoral (TGF-beta), que está relacionado com a progressão de diversos tipos tumorais, incluindo o CP (ROSHANI; MCCARTHY; HAGEMANN, 2014). É descrito que a sinalização desse processo ocorre através de receptores treonina/serina quinase, o que é coincidente com os nossos resultados (MIYAZONO; KAMIYA; MORIKAWA, 2010). Portanto, a atuação da técnica de SBRT promoveu a diminuição deste, o que está relacionado com melhor prognóstico e efetividade do tratamento.

A respeito da família BMP e tumores, Katoh (2017), demonstrou que a mesma está relacionada com a ativação canônica da via WNT. O papel dessas moléculas é bem descrito no processo de diferenciação das chamadas “*câncer stem cells*”, promovendo crescimento tumoral, invasão e metástase. Além disso, ficou demonstrado que BMP4, BMP6 e BMP9, induzem crescimento de células endoteliais *in vivo e in vitro*, relacionando estas diretamente com o processo angiogênico, fundamental para a tumorigênese (SUZUKI et al., 2010). Portanto a atuação da técnica de SBRT ocasionou diminuição deste, o que está relacionado com um melhor prognóstico e efetividade do tratamento do CP.

Já sobre o gene GDF15, também conhecido como MIC-1 (citocina inibidora de macrófagos 1), é descrita a relação deste com a via do TGF-beta, assim como o BMP. Esta molécula se apresenta com maior expressão em condições patológicas, como lesões, inflamações e em diversos tumores. Este apresenta papel fundamental na carcinogênese, atuando na proliferação celular, migração, e inibição da apoptose em diversos tipos tumorais sólidos, como no caso do CP (WANG et al. 2014). Esses mesmos autores descreveram MIC-1 como um possível biomarcador sérico para detecção de adenocarcinoma pancreático. Isso é complementado, através de dados de pacientes que apresentavam alta expressão deste gene em CP avançado, onde este está atrelado a maior inflamação, anorexia e até mesmo caquexia dos pacientes, e consequentemente, pior prognóstico (SUZUKI et al., 2021). A respeito desta última condição patológica, Vaes e colaboradores (2020), demonstraram que a secreção de GDF15 em organóides de pacientes caquéticos de CP é maior do que sua secreção em pacientes não caquéticos, enfatizando a relação que este gene tem com tal processo. Por conta desta e mais descobertas sobre o gene, o mesmo vem ganhando mais atenção do meio científico, sendo considerado um possível biomarcador para o tratamento da caquexia causada por câncer. As

nossas análises evidenciaram que a radioterapia, quando administrada como tratamento exclusivo, teve papel fundamental na diminuição da expressão de MIC-1, sugerindo o gene como um biomarcador para a eficácia deste tipo de tratamento no CP.

Entre os genes relacionados com organização e degradação da MEC que mostraram-se *down* regulados, destacou-se ADAM9 (desintegrina e metaloprotease 9), que apresenta relevância em diversos tumores sólidos, incluindo o CP. Este codifica uma protease de superfície celular relacionada com processos de migração celular, resposta inflamatória, proliferação e interações célula-célula. No CP, a alta expressão desse gene está atrelada a um pior prognóstico, pois há maior taxa de invasão e proliferação celular associada com transição epitélio-mesênquima (ORIA; LOPATTA; SCHILLING, 2018). Além disso, ADAM9 apresenta grande relação com MEC ao mediar os processos de migração e adesão das células tumorais pancreáticas, permitindo a comunicação destas com proteínas presentes na matriz, como fibronectina, tenascina e vitronectina. Logo, há relação de ADAM9 com a invasão de tecido vascular na região tumoral, promovendo assim angiogênese e progressão tumoral (ORIA et al., 2019).

Por fim, analisando o conjunto de genes *down* regulados, outros dois processos enriquecidos em nossas análises estão associados com a ativação do sistema complemento. Tal sistema é prontamente ativado pela presença de danos associados a padrões moleculares na superfície das células tumorais (MANGOGNA et al., 2021). Esta ativação é responsável por uma inflamação no local do tumor, que segundo o estudo realizado Deng et al. 2021, demonstrou estar relacionado com a ocorrência de caquexia, fazendo com que haja um pior prognóstico, similar ao descrito anteriormente em nosso trabalho para o gene GDF15/MIC-1.

7. Conclusão

Dessa forma, com o nosso estudo podemos afirmar que o tratamento com a radioterapia, mais especificamente a técnica de SBRT, é eficiente para pacientes com CP, dado que o mesmo diminuiu a expressão de genes relacionados com processos fundamentais da patogênese deste tipo tumoral, tais como transição epitélio/mesênquima, angiogênese, proliferação e invasão celular e até mesmo caquexia. O nosso trabalho elaborou um protocolo de análise e validação de dados relacionados com a radioterapia, utilizando apenas ferramentas *in silico*, algo que é mais comumente realizado com o tratamento quimioterápico. Além disso, os nossos resultados destacam MIC-1 como possível biomarcador para atestar a efetividade exclusiva do tratamento

radioterápico para o CP. Ainda assim, novos estudos devem ser realizados para a validação funcional e complementação dos dados aqui fornecidos.

8. Referências Bibliográficas

BENJAMIN J. RAPHAEL; HRUBAN, R. H.; AGUIRRE, A. J.; MOFFITT, R. A.; FEI, S. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

BLOY, N.; POL, J.; MANIC, G.; VITALE, I.; EGGERMONT, A.; GALON, J.; TARTOUR, E.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G.; GALLUZZI, L. Trial watch: Radioimmunotherapy for oncological indications. **OncoImmunology**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 1–13, 2014.

BOUCHART, C.; NAVEZ, J.; CLOSSET, J.; HENDLISZ, A.; VAN GESTEL, D.; MORETTI, L.; VAN LAETHEM, J. L. Novel strategies using modern radiotherapy to improve pancreatic cancer outcomes: toward a new standard? **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, [s. l.], v. 12, p. 1–26, 2020.

BYUN, H. K.; HAN, M. C.; YANG, K.; KIM, J. S.; YOO, G. S.; KOOM, W. S.; KIM, Y. B. Physical and biological characteristics of particle therapy for oncologists. **Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 611–620, 2021.

CAPASSO, M.; FRANCESCHI, M.; RODRIGUEZ-CASTRO, K. I.; CRAFA, P.; CAMBIÈ, G.; MIRAGLIA, C.; BARCHI, A.; NOUVENNE, A.; LEANDRO, G.; MESCHI, T.; DE' ANGELIS, G. L.; DI MARIO, F. Epidemiology and risk factors of pancreatic cancer. **Acta Biomedica**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 141–146, 2018.

CAPECE, D.; VERZELLA, D.; TESSITORE, A.; ALESSE, E.; CAPALBO, C.; ZAZZERONI, F. Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF- κ B. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 78, p. 51–61, 2018.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2017.08.004>>

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.

CHEN, M.; ZHAO, H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. **Human genomics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 34, 2019.

DENG, M.; VAES, R. D. W.; VAN BIJNEN, A. A. J. H. M.; OLDE DAMINK, S. W. M.; RENSEN, S. S. Activation of the complement system in patients with cancer cachexia. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 22, 2021.

DISCOVERY, C. D. **Molecular Targeted Radiosensitizers**. [s.l: s.n.].

DOBIASCH, S.; GOERIG, N. L.; FIETKAU, R.; COMBS, S. E. Essential role of radiation therapy for the treatment of pancreatic cancer: Novel study concepts and established treatment recommendations. **Strahlentherapie und Onkologie**, [s. l.], v. 194, n. 3, p. 185–195, 2018.

FARREN, M. R.; SAYEGH, L.; WARE, M. B.; CHEN, H. R.; GONG, J.; LIANG, Y.; KRASINSKAS, A.; MAITHEL, S. K.; ZAIDI, M.; SARMIENTO, J. M.; KOOBY, D.; PATEL, P.; EL-RAYES, B.; SHAIB, W.; LESINSKI, G. B. Immunologic alterations in the pancreatic cancer microenvironment of patients treated with neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy. **JCI Insight**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–13, 2020.

FONG, Z. V.; WINTER, J. M. Biomarkers in Pancreatic Cancer. **The Cancer Journal**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 530–538, 2012.

HEINRICH, S.; LANG, H. Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: Definitions and benefits. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 8, 2017.

HUGUET, F.; GOODMAN, K. A.; AZRIA, D.; RACADOT, S.; ABRAMS, R. A. Radiotherapy technical considerations in the management of locally advanced pancreatic cancer: American-French consensus recommendations. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 1355–1364, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.11.050>>

KAMISAWA, T.; WOOD, L. D.; ITOI, T.; TAKAORI, K. Pancreatic cancer. **The Lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10039, p. 73–85, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00141-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00141-0)>

KATOH, M. Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 1357–1369, 2017.

KLEEFF, J.; KORC, M.; APTE, M.; LA VECCHIA, C.; JOHNSON, C. D.; BIANKIN, A. V.; NEALE, R. E.; TEMPERO, M.; TUVESON, D. A.; HRUBAN, R. H.; NEOPTOLEMOS, J. P. Pancreatic cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, n. April, p. 1–23, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>>

LANDAU, E.; KALNICKI, S. The Evolving Role of Radiation in Pancreatic Cancer. **Surgical Clinics of North America**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 113–125, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.09.008>>

LOVEDAY, B. P.; LIPTON, L.; THOMSON, B. N.; HAND, F.; CONLON, K. C. **Pancreatic cancer: An update on diagnosis and management**, 2019.

LUCHINI, C.; CAPELLI, P.; SCARPA, A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. **Surgical Pathology Clinics**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 547–560, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2016.05.003>>

LV, K.; YANG, J.; SUN, J.; GUAN, J. Identification of key candidate genes for pancreatic cancer by bioinformatics analysis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], n. 2, p. 451–458, 2019.

MANGOGNA, A.; VARGHESE, P. M.; AGOSTINIS, C.; ALROKAYAN, S. H.; KHAN, H. A.; STOVER, C. M.; BELMONTE, B.; MARTORANA, A.; RICCI, G.; BULLA, R.; KISHORE, U. Prognostic Value of Complement Properdin in Cancer. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. January, p. 1–16, 2021.

MILLS BN, QIU H., DRAGE G., CHEN C. et al. Modulation of the Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Immune Microenvironment by Stereotactic Body Radiotherapy. **Clin Cancer Res** 2022 Jan 1;28(1):150-162. PMID: [34862242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34862242/)

MIYAZONO, K.; KAMIYA, Y.; MORIKAWA, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 147, n. 1, p. 35–51, 2010.

NEOPTOLEMOS, J. P.; KLEEFF, J.; MICHL, P.; COSTELLO, E.; GREENHALF, W.; PALMER, D. H. Therapeutic developments in pancreatic cancer: Current and future perspectives. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 333–348, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41575-018-0005-x>>

OKUNO, E. Radiação. Efeitos, riscos e benefícios. **Ed. Harbra**, 2007.

OLIVEIRA, G.; FREIRE, P. P.; CURY, S. S.; DE MORAES, D.; OLIVEIRA, J. S.; DAL-PAI-SILVA, M.; DO REIS, P. P.; CARVALHO, R. F. An integrated meta-analysis of secretome and proteome identify potential biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2020.

ORIA, V. O.; LOPATTA, P.; SCHILLING, O. The pleiotropic roles of ADAM9 in the biology of solid tumors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 75, n. 13, p. 2291–2301, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2796-x>>

ORIA, V. O.; LOPATTA, P.; SCHMITZ, T.; PRECA, B. T.; NYSTRÖM, A.; CONRAD, C.; BARTSCH, J. W.; KULEMANN, B.; HOEPPNER, J.; MAURER, J.; BRONSERT, P.; SCHILLING, O. ADAM9 contributes to vascular invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 456–479, 2019.

PALTA, M.; GODFREY, D.; GOODMAN, K. A.; HOFFE, S.; DAWSON, L. A.; DESSERT, D.; HALL, W. A.; HERMAN, J. M.; KHORANA, A. A.; MERCHANT, N.; PAREKH, A.; PATTON, C.; PEPEK, J. M.; SALAMA, J. K.; TULI, R.; KOONG, A. C. Radiation Therapy for Pancreatic Cancer: Executive Summary of an ASTRO Clinical Practice Guideline. **Practical Radiation Oncology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 322–332, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prro.2019.06.016>>

REN, B.; CUI, M.; YANG, G.; WANG, H.; FENG, M.; YOU, L.; ZHAO, Y. Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–15, 2018.

ROBIN, T. P.; GOODMAN, K. A. Radiation therapy in the management of pancreatic adenocarcinoma: Review of current evidence and future opportunities. **Chinese Clinical Oncology**, [s. l.], v. 6, n. 3, 2017.

ROMEIJN, H. E.; AHUJA, R. K.; DEMPSEY, J. F.; KUMAR, A. A column generation approach to radiation therapy treatment planning using aperture modulation. **SIAM Journal on Optimization**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 838–862, 2005.

ROSHANI, R.; MCCARTHY, F.; HAGEMANN, T. Inflammatory cytokines in human pancreatic cancer. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 345, n. 2, p. 157–163, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.014>>

RUSSELL WMS, BURCH RL. 1959. (as reprinted 1992). The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare.

SARVEPALLI, D.; RASHID, M. U.; RAHMAN, A. U.; ULLAH, W.; HUSSAIN, I.; HASAN, B.; JEHANZEB, S.; KHAN, . K.; JAIN, A. G.; KHETPAL, N.; AHMAD, S. Gemcitabine: A Review of Chemoresistance in Pancreatic Cancer. [s. l.], v. 24, n. 2, p. 199–212, 2019.

SCHILITZH, A. O. C.; LIMA, F. C. da S. De; OLIVEIRA, J. F. P.; SANTOS, M. de O.; REBELO, M. S. **Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

SESHACHARYULU, P.; BAINE, M. J.; SOUCHEK, J. J.; MENNING, M.; KAUR, S.; YAN, Y.; OUELLETTE, M. M.; JAIN, M.; LIN, C.; BATRA, S. K. Biological determinants of radioresistance and their remediation in pancreatic cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1868, n. 1, p. 69–92, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.02.003>>

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 7–33, 2021.

SUZUKI, H.; MITSUNAGA, S.; IKEDA, M.; AOYAMA, T.; YOSHIZAWA, K.; YOSHIMATSU, H.; KAWAI, N.; MASUDA, M.; MIURA, T.; OCHIAI, A. Clinical and tumor characteristics of patients with high serum levels of growth differentiation factor 15 in advanced pancreatic cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 19, 2021.

SUZUKI, Y.; OHGA, N.; MORISHITA, Y.; HIDA, K.; MIYAZONO, K.; WATABE, T. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 123, n. 10, p. 1684–1692, 2010.

VAES, R. D. W.; VAN DIJK, D. P. J.; WELBERS, T. T. J.; BLOK, M. J.; ABERLE, M. R.; HEIJ, L.; BOJ, S. F.; OLDE DAMINK, S. W. M.; RENSEN, S. S. Generation and initial characterization of novel tumour organoid models to study human pancreatic cancer-induced cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1509–1524, 2020.

VAREEDAYAH, A. A.; ALKAADE, S.; TAYLOR, J. R. Pancreatic Adenocarcinoma. [s. l.], n. June, 2018.

WANG, X.; LI, Y.; TIAN, H.; QI, J.; LI, M.; FU, C.; WU, F.; WANG, Y.; CHENG, D.; ZHAO, W.; ZHANG, C.; WANG, T.; RAO, J.; ZHANG, W. Macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1/GDF15) as a novel diagnostic serum biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–11, 2014.

WILLIAMS, P. D.; CHEON, S.; HAVALESHKO, D. M.; JEONG, H.; THEODORESCU, D.; LEE, J. K. of Cancer Patients Undergoing Systemic Therapy. [s. l.], v. 69, n. 21, p. 8302–8309, 2010.

WISHART, G.; GUPTA, P.; SCHETTINO, G.; NISBET, A.; VELLIU, E. 3D Tissue Models As Tools for Radiotherapy Screening for Pancreatic Cancer. **The British journal of radiology**, [s. l.], v. 94, n. 1120, p. 20201397, 2021.

XIE, L.; WANG, L.; ZHU, W.; ZHAO, J.; GUO, X. Editorial: Bioinformatics Tools (and Web Server) for Cancer Biomarker Development. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, n. October, p. 1–3, 2020.

ZENG, S.; PÖTTLER, M.; LAN, B.; GRÜTZMANN, R.; PILARSKY, C.; YANG, H. Chemoresistance in pancreatic cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, p. 1–19, 2019.

ZHENG, H.; ZHANG, G.; ZHANG, L.; WANG, Q.; LI, H.; HAN, Y.; XIE, L.; YAN, Z.; LI, Y.; AN, Y.; DONG, H.; ZHU, W.; GUO, X. Comprehensive Review of Web Servers and Bioinformatics Tools for Cancer Prognosis Analysis. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, n. February, 2020.

9. Anexo

Tabela Suplementar 1 - Conjunto de genes down regulados encontrados em cada um dos estudos selecionados.

Genes Down Regulados	Log2 Fold Change
(GSE129492)	
ADAM12	-1.471667
ADAM9	-1.423333
ADAMTS18	-1.658333
AFP	-1.291667
AMBN	-1.985
BMP6	-1.405
BPIFA2	-1.755

BPIFB1	-1.743333
C1orf54	-1.613333
C1QTNF3	-1.793333
C1QTNF5	-1.543333
C1QTNF7	-1.711667
C2	-1.398333
C5orf46	-1.991667
C6orf15	-1.508333
C8G	-1.316667
COL9A2	-1.753333
CRISPLD1	-1.723333
CRTAC1	-1.575
(GSE185311)	
GDF15	-1.62749
EDA2R	-1.49514
DDB2	-1.05714
FDXR	-1.32329
ZMAT3	-1.33547
PAPPA	-1.00156