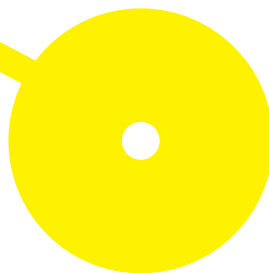




Validação de deteção de mutações
KRAS em muco pancreático como
ferramenta preditiva e de apoio à
decisão terapêutica em doentes com
Neoplasia Mucínosa Papilar
Intraductal do pâncreas

Ângela Maria Pinto de Jesus

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



**UNIDADE LOCAL DE SAÚDE
COIMBRA**

**Validação de deteção de mutações *KRAS* em muco pancreático como ferramenta
preditiva e de apoio à decisão terapêutica em doentes com Neoplasia Mucinoso
Papilar Intraductal do pâncreas**

Autor

Ângela Maria Pinto de Jesus

Orientadores

Doutor Rui Caetano Oliveira, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Doutora Sara Costa Granja, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Ramo Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A conclusão desta tese representa o culminar de uma fase de intensa dedicação, desafios e aprendizagens, que não seria possível sem o apoio incondicional e a colaboração de várias pessoas.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais, por serem as minhas maiores fontes de inspiração e apoio. A confiança, amor e incentivo que sempre me deram foram fundamentais para que eu pudesse alcançar mais esta etapa da minha vida. Agradeço-lhes por terem sempre acreditado em mim e nos meus sonhos.

Ao meu querido Pedro, a minha mais profunda gratidão. Foi o meu alicerce em todos os momentos deste percurso, oferecendo-me não apenas o seu amor incondicional, mas também a sua infinita paciência, compreensão nos momentos mais difíceis e motivação nos momentos de dúvida.

Gostaria de estender os meus agradecimentos a todos os colegas de trabalho, que sempre se mostraram solidários e compreensivos ao longo deste percurso. Agradeço por estarem ao meu lado nos momentos de maior tensão e por compreenderem as ausências necessárias para que eu me pudesse dedicar a esta tese. Agradeço especialmente à Dra. Maria Augusta Cipriano e à Dra. Paula Agapito, que me deram a oportunidade de realizar este mestrado e me apoiaram durante todo o processo.

Aos meus colegas de mestrado, expresso a minha gratidão pelas valiosas trocas de ideias, pelas discussões construtivas e pelo apoio mútuo durante esta jornada.

Aos meus orientadores, Doutor Rui Caetano Oliveira e Doutora Sara Granja, cuja orientação e sabedoria foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Agradeço pela paciência, pelos conselhos e pelo tempo dedicado.

Gostaria também de expressar a minha sincera gratidão à Dr.^a Maria João Amaral pela valiosa colaboração na cedência dos dados clínicos fundamentais para a concretização deste estudo.

Por fim, agradeço à minha filha, Maria Luísa, que estava na minha barriga quando comecei a escrever esta tese. Foi, desde o início, uma fonte invisível e poderosa de motivação e força. Que esta tese, de alguma forma, seja também uma pequena parte do legado que estou a construir e que inspire o seu percurso de descobertas e realizações.

Resumo

O cancro do pâncreas é das neoplasias mais mortais, com taxas de incidência e mortalidade quase idênticas, devido à dificuldade no diagnóstico precoce, causado por sintomas inespecíficos e pela falta de biomarcadores e ferramentas de rastreio adequadas.

Lesões precursoras, como a Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) são um desafio clínico, sendo o *KRAS* central na progressão neoplásica.

O diagnóstico definitivo é feito através de amostras obtidas por biópsia/punção aspirativa ou cirurgia, mas é necessário implementar métodos complementares de diagnóstico e *follow-up* menos invasivos.

A biópsia líquida surge como ferramenta promissora, utilizando sangue e muco pancreático, para rastrear, diagnosticar e avaliar a progressão da doença.

O objetivo deste estudo é validar a deteção de mutações *KRAS* em amostras de muco pancreático como ferramenta preditiva e de apoio à decisão terapêutica em doentes com IPMN do pâncreas.

Analisou-se a deteção de mutações *KRAS* em amostras de muco e tecido de 12 pacientes com diagnóstico de IPMN. A análise por PCR em tempo real revelou mutação em 75% das amostras, sendo a concordância entre os resultados de 100%.

Isto sugere o uso potencial do muco pancreático como ferramenta preditiva de mutações *KRAS*, para apoio à decisão terapêutica em casos de IPMN do pâncreas.

Palavras-chave: Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN) do pâncreas, *KRAS*, biópsia líquida, muco pancreático, PCR em tempo real.

Abstract

Pancreatic cancer is one of the most lethal neoplasms, with almost identical incidence and mortality rates, due to the difficulty in early diagnosis, caused by non-specific symptoms and the lack of biomarkers and adequate screening tools.

Precursor lesions such as Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia (IPMN) are a clinical challenge, with *KRAS* being central to neoplastic progression.

The definitive diagnosis is made through samples obtained by biopsy/puncture aspiration or surgery, but it is necessary to implement complementary less invasive diagnostic and follow-up methods.

Liquid biopsy emerges as a promising tool, using blood and pancreatic mucus, to track, diagnose and evaluate disease progression.

The objective of this study is to validate the detection of *KRAS* mutations in pancreatic mucus samples as a predictive tool and to support therapeutic decision-making in patients with IPMN of the pancreas.

We analyzed the detection of *KRAS* mutations in mucus and tissue samples from 12 patients diagnosed with IPMN. Real-time PCR analysis revealed mutations in 75% of the samples, with agreement between the results being 100%.

This suggests the potential use of pancreatic mucus as a predictive tool for *KRAS* mutations, to support therapeutic decisions in cases of IPMN of the pancreas.

Keywords: Pancreatic Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia (IPMN), *KRAS*, liquid biopsy, pancreatic mucus, real-time PCR.

Índice

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introdução | 1 |
| 1.1. | Fatores de risco e manifestações clínicas | 2 |
| 1.2. | Lesões pancreáticas mais comuns | 3 |
| 1.3. | Alterações moleculares..... | 6 |
| 1.4. | Diagnóstico, estadiamento e monitorização | 9 |
| 1.4.1. | Biópsia histológica e punção aspirativa..... | 9 |
| 1.4.2. | Biópsia líquida | 11 |
| 1.5. | Biomarcadores de muco pancreático | 12 |
| 1.6. | Objetivos..... | 13 |
| 2. | Materiais e métodos | 15 |
| 2.1. | Amostragem | 15 |
| 2.2. | Critérios de inclusão e exclusão do estudo..... | 15 |
| 2.2.1. | Critérios de inclusão no estudo | 15 |
| 2.2.2. | Critérios de exclusão no estudo..... | 16 |
| 2.3. | Processamento do muco pancreático..... | 16 |
| 2.4. | Preparação e processamento da amostra histológica..... | 16 |
| 2.5. | PCR em tempo real..... | 18 |
| 2.6. | Interpretação dos resultados | 21 |
| 2.7. | Análise estatística..... | 21 |
| 3. | Resultados | 23 |
| 3.1. | Caracterização da amostragem..... | 23 |
| 3.2. | Análise mutacional de <i>KRAS</i> | 25 |
| 4. | Discussão | 28 |
| 5. | Conclusão | 32 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 6. Referências Bibliográficas | 33 |
|-------------------------------------|----|

Índice de Abreviaturas

BD-IPMN - Neoplasia mucinosa papilar intraductal dos ductos secundários

BRCA - Breast cancer associated gene

cAMP - Monofosfato cíclico de adenosina

CA19.9 - Antígeno de carboidratos 19.9

CEA - Antígeno carcinoembrionário

Cq - Ciclo de quantificação

CDKN2A - Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

Cqmutan - Ciclo de quantificação do sinal mutante

CqSPC - Ciclo de quantificação do controle de processamento

ctDNA - DNA tumoral circulante

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EUS-FNA - Citologia por agulha fina auxiliada por endoscopia

FA - Anemia de Fanconi

FFPE - Fixado em formol e embebido em parafina

GNAS - Guanine Nucleotide Binding Protein Alpha Stimulating

G α s - Proteína G estimuladora

G12 - Guanina do codão 12

HE - Hematoxilina eosina

HGD - Displasia de alto grau

HR - *Hazard ratio*

IARC - Agência internacional para a investigação em cancro

IPMN - Neoplasia mucinosa papilar intraductal

KRAS - Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

LGD - Displasia de baixo grau

MD-IPMN - Neoplasia mucinosa papilar intraductal do ducto principal

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MSH2 - Muts homolog 2

MSH6 - Muts homolog 6

MT-IPMN - Neoplasia mucinosa papilar intraductal de tipo misto

NM - Neoplasia mucinosa

OMS - Organização mundial de saúde

PanINs - Neoplasias intraepiteliais pancreáticas

PARP - Poli ADP-ribose polimerase

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDAC - Adenocarcinoma ductal pancreático

PD-L1 - Ligando de morte programada 1

PKA - Proteína quinase A

RNF43 - Ring Finger Protein 43

SMAD4 - Mothers against decapentaplegic homolog 4

SPC - Sinais de controlo do processamento

TNE - Tumor Neuroendócrino

TP53 - Tumor protein 53

ULS - Unidade local de saúde

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estimativa mundial de números absolutos, incidência e mortalidade por tipo de cancro, em ambos os sexos e todas as idades, no ano de 2022, com destaque para o cancro do pâncreas. | 1 |
| Figura 2 – Três secções seriadas de uma peça de pancreatectomia onde se identifica uma Neoplasia mucinosa papilar intraducal no ducto principal, com muco no seu interior. | 5 |
| Figura 3 – Progressão molecular do Adenocarcinoma ductal do pancreático..... | 7 |
| Figura 4 – Biópsia de lesão pancreática obtida por EUS-FNA..... | 10 |
| Figura 5 – Critérios recomendados para a seleção da amostra no Idylla™ <i>KRAS</i> Mutation Test..... | 17 |
| Figura 6 – Sistema Biocartis Idylla™ | 18 |
| Figura 7 – Tipos de resultados obtidos pelo Sistem Biocartis Idylla™ | 21 |
| Figura 8 – Representação gráfica da distribuição por sexo | 23 |
| Figura 9 – Representação gráfica da categorização por idade | 24 |
| Figura 10 – Representação gráfica do diagnóstico histopatológico..... | 24 |
| Figura 11 – Representação gráfica do grau de displasia | 25 |
| Figura 12 – Representação gráfica do número de mutações <i>KRAS</i> detetadas no muco e tecido pancreáticos..... | 26 |
| Figura 13 – Representação gráfica das mutações específicas detetadas | 26 |
| Figura 14 – Representação gráfica da concordância de resultados entre muco e tecido pancreáticos .. | 27 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Mutações <i>KRAS</i> detetadas pelo Sistema Biocartis Idylla™ | 19 |
|--|----|

1. Introdução

O cancro do pâncreas é, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Agência Internacional para a Investigação em Cancro (IARC, do *inglês International Agency for Research on Cancer*), relativamente raro quando comparado com outros tipos de cancro, contudo é um dos mais letais, sendo caracterizado por uma mortalidade bastante alta. Representa aproximadamente 3% de todos os cancros e 7% de todas as mortes por cancro. Em 2022, a estimativa mundial foi de cerca de 510.992 novos casos e 467.409 mortes, segundo o *Global Cancer Observatory*(Figura 1) (1).

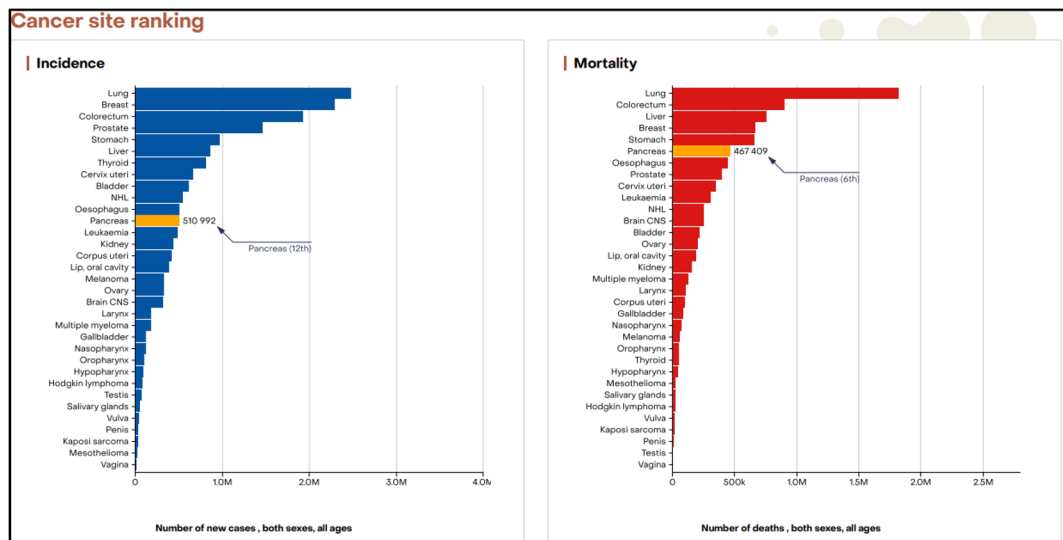


Figura 1 – Estimativa mundial de números absolutos, incidência e mortalidade por tipo de cancro, em ambos os sexos e todas as idades, no ano de 2022, com destaque para o cancro do pâncreas (1).

Nos Estados Unidos, o cancro do pâncreas é a décima primeira neoplasia mais comum, mas destaca-se como a terceira principal causa de morte por cancro, com aproximadamente 60.127 novos casos diagnosticados e cerca de 49.491 mortes. Na Europa a incidência de cancro do pâncreas ronda os 146.477 novos casos e a mortalidade é igualmente elevada, com 138.644 mortes anuais. Em Portugal, o cenário é igualmente preocupante. O cancro do pâncreas é uma das neoplasias com maior taxa de mortalidade, com 2158 casos diagnosticados em 2022 e 2086 mortes associadas à doença (1).

1.1. Fatores de risco e manifestações clínicas

A incidência do cancro do pâncreas aumenta com a idade, sendo raro em pessoas com menos de 45 anos, e mais comum em pessoas acima de 65 anos. Há uma ligeira predominância em homens em comparação com mulheres e está associado a diversos fatores de risco que podem aumentar a probabilidade de desenvolvimento da doença (2). Entre os principais fatores de risco, destacam-se os fatores genéticos e hereditários, onde as mutações genéticas desempenham um papel significativo. Aproximadamente 10% dos casos de cancro do pâncreas são considerados hereditários, e indivíduos com história familiar de cancro do pâncreas têm um risco significativamente aumentado, especialmente se houver múltiplos familiares em primeiro grau afetados (3). Além dos fatores genéticos, fatores relacionados com o estilo de vida são também importantes contribuintes. O tabagismo é um dos principais fatores de risco modificáveis, sendo responsável por cerca de 20-30% dos casos de cancro do pâncreas. O risco é diretamente proporcional à quantidade e duração do consumo de tabaco (4). A obesidade e o sedentarismo são outros fatores importantes. O excesso de peso e a falta de atividade física estão associados a um risco aumentado de desenvolvimento da doença, possivelmente devido a alterações metabólicas e inflamatórias no organismo. A diabetes mellitus, também é considerada um fator de risco significativo, existindo uma relação bidirecional, onde o cancro do pâncreas pode ser tanto uma causa quanto uma consequência da diabetes (5). Pancreatite crónica está associada a um risco aumentado de cancro do pâncreas devido a inflamação persistente e danos no tecido pancreático. Fatores dietéticos, como dietas ricas em carnes processadas, gordura e açúcar e pobres em frutas e vegetais, e o consumo excessivo de álcool também desempenham um papel na etiologia do cancro do pâncreas, podendo aumentar o risco de o desenvolver (6). De acordo com os dados mais recentes da Sociedade Americana de Cancro a taxa de sobrevivência global aos 5 anos subiu para cerca de 13%, embora continue extremamente baixa. A sobrevivência é ainda menor para os casos com doença metastática, sendo cerca de 3% (7).

O cancro do pâncreas é notoriamente difícil de diagnosticar precocemente, o que contribui para a sua alta taxa de mortalidade. Clinicamente, esta doença manifesta-se de forma silenciosa e só se torna evidente em estadios avançados, quando o tumor já compromete estruturas vitais. Entre os sintomas mais comuns, destaca-se a icterícia, que ocorre devido à obstrução do ducto biliar comum pelo tumor, levando a acumulação de bilirrubina no

sangue (8). Outro sintoma frequente é dor abdominal, que geralmente é sentida na região superior do abdómen e pode irradiar para as costas. Esta dor é tipicamente persistente e pode ser exacerbada quando o paciente se deita de costas. A perda de peso inexplicada e a falta de apetite são também sinais preocupantes e comuns, muitas vezes associados a uma sensação de mal-estar geral (9). Diabetes mellitus de início recente ou alteração dos valores em diabéticos conhecidos pode ser indicador de cancro de pâncreas, especialmente em indivíduos com mais de 50 anos. Este fenómeno ocorre porque o tumor pode interferir na função das células que produzem insulina, células beta das ilhotas de Langerhans (5). Outros sintomas incluem náuseas, vômitos e mudanças nos hábitos intestinais, como diarreia ou fezes oleosas, que são resultado da má absorção de nutrientes devido à obstrução do ducto pancreático. Além disso, pode haver fadiga extrema e fraqueza, que são sintomas não específicos mas bastante debilitantes para o paciente (10). A baixa taxa de sobrevivência global do cancro de pâncreas deve-se em grande parte à detecção tardia, já que a doença é clinicamente silenciosa e apresenta sintomas muito inespecíficos em estadios iniciais (11–13). O tratamento curativo disponível é a ressecção cirúrgica completa, quando possível, tornando a deteção em estadios precoces e ressecáveis de extrema importância (14).

1.2. Lesões pancreáticas mais comuns

Os diferentes tipos de cancros do pâncreas variam em origem, comportamento biológico e resposta ao tratamento, sendo o mais comum o Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, do inglês *Pancreatic ductal adenocarcinoma*), responsável por aproximadamente 90% dos casos de cancro do pâncreas (15). Este tipo de cancro tem origem nas células glandulares que revestem os ductos pancreáticos, que são responsáveis pela produção e transporte de enzimas digestivas. Pode ocorrer em qualquer parte do pâncreas, mas é mais frequentemente encontrado na cabeça do pâncreas. As células tumorais formam estruturas glandulares e podem apresentar um padrão de crescimento sólido ou ductiforme. O tumor é caracterizado por uma arquitetura glandular desorganizada, sendo estas células geralmente grandes, atípicas e com núcleos hipercromáticos. A presença de mitoses atípicas é comum, indicando alta atividade proliferativa (16). É, portanto, uma doença heterogénea, caracterizada pela acumulação de anomalias moleculares e genéticas

e mutações ativadoras do gene *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* presentes em 90% dos casos de PDAC (11,17). Esta doença pode ter um componente familiar ou hereditário. No caso de PDAC familiar, existem vários membros da mesma família afetados pela doença, contudo não está identificada nenhuma mutação genética. Por sua vez o cancro do pâncreas hereditário desenvolve-se quando há uma clara predisposição genética relacionada com o aparecimento desta doença numa família, podendo estar associada a mutações genéticas específicas, conhecidas por aumentar o risco de desenvolvimento da doença (18,19). Ambos representam uma percentagem relativamente pequena dos casos de PDAC, cerca de 5-10%. A grande maioria dos casos é considerada esporádica (20). A taxa de sobrevivência global aos 5 anos é de 11% para todos os estadios combinados (1).

Outro tipo de lesão frequente no pâncreas é a Neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN, do inglês *Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm*) que representa cerca de 21-41% da totalidade das neoplasias quísticas do pâncreas e 1-2% de toda a patologia que envolve o pâncreas (21) que, embora sendo inicialmente benigna, tem um forte potencial para progredir para PDAC. Trata-se de uma lesão quística com origem nos ductos pancreáticos, caracterizada pela produção de muco e pela formação de papilas que se projetam para dentro dos ductos pancreáticos dilatados (22). São classificadas, clínica e radiologicamente, como lesões pré-malignas devido ao seu potencial para evoluir para adenocarcinoma e são subdivididas em três tipos principais com base na localização no pâncreas e nas características histológicas: IPMN do Ducto principal (MD-IPMN, do inglês *Main Duct - Intraductal Papillary Mucinous Neoplasma*) que tem origem no ducto pancreático principal, está associada a um risco mais elevado de progressão para carcinoma invasivo e requer monitorização cuidada e frequentemente intervenção cirúrgica; IPMN dos Ductos secundários (BD-IPMN, do inglês *Branch Duct - Intraductal Papillary Mucinous Neoplasma*) que tem origem nos ductos secundários do pâncreas, geralmente possui um risco menor de malignidade em comparação com MD-IPMN e a abordagem pode variar desde monitorização até ressecção cirúrgica, dependendo das características da lesão; IPMN de Tipo Misto (MT-IPMN, do inglês *Mixed Typt - Intraductal Papillary Mucinous Neoplasma*) que combina riscos e características de ambos os tipos, sendo necessário uma abordagem personalizada (23).

O exame macroscópico de amostras cirúrgicas de IPMN geralmente revela lesões visíveis, com dilatação do ducto principal ou quistos com comunicação ao sistema ductal pancreático. Um sinal típico é a excreção de mucina da Ampola de Vater dilatada (Figura 2).



Figura 2 - Três secções seriadas de uma peça de pancreatectomia onde se identifica uma Neoplasia mucinosa papilar intraducal no ducto principal, com muco no seu interior. A seta indica o local exato da lesão.

A identificação do ducto pancreático principal é crucial para a classificação, e o tamanho da lesão é importante para avaliação de risco e correlação com achados radiológicos (24). As IPMNs frequentemente apresentam componentes quísticos e qualquer componente sólido deve levantar suspeitas de carcinoma invasivo. A morfologia macroscópica destas lesões depende da sua localização: as MD-IPMN podem mostrar dilatação e projeções papilares, estando, a maioria, localizadas na cabeça do pâncreas, mas algumas estão no corpo ou cauda. As BD-IPMN são encontradas em ramos secundários com aparência de quistos mucinosos e normalmente não causam obstrução, sendo mais comuns na cabeça do pâncreas e no processo uncinado, podendo ser multifocais. As MT-IPMN, afetam tanto os ductos primários quanto secundários e podem ser uma extensão do tipo MD-IPMN (25). Segundo a OMS, estas lesões são classificadas em IPMN de Tipo Gástrico, Tipo Pancreatobiliar e Tipo Intestinal, com base nas características morfológicas do epitélio, e no grau de displasia em displasia de baixo grau (LGD, do inglês *low grade displasia*) e displasia de alto grau (HGD, do inglês *high grade displasia*), respetivamente menos e mais propensas à progressão para malignidade.

As IPMNs do tipo gástrico são as mais comuns, geralmente LGD, mas podem mostrar HGD e adenocarcinoma invasivo. As IPMNs do tipo intestinal são a segunda forma mais comum,

frequentemente com HGD e associadas a carcinoma invasivo do subtipo mucinoso, que tem um melhor prognóstico. O tipo pancreatobiliar, menos comum, desenvolve-se no ducto principal e apresenta papilas mais complexas, com a maioria das lesões sendo de alto grau (25).

O prognóstico dos pacientes com IPMN difere amplamente com base no tipo de IPMN e no grau de displasia, sendo que, a taxa de sobrevivência global aos 5 anos para estes pacientes varia de acordo com o risco de malignidade, sendo relativamente alta para IPMN de baixo risco, 70–90% dos casos, e significativamente menor para aquelas que progridem para carcinoma invasivo, aproximadamente 10% a 20% dos casos de IPMN (26). Nos últimos anos, têm sido feitas pesquisas para melhor compreender os mecanismos moleculares subjacentes à progressão desta doença e para desenvolver novas estratégias diagnósticas e terapêuticas com foco em mutações em genes como o *KRAS*, *Guanine nucleotide-binding protein alpha stimulating activity polypeptide (GNAS)* e *Ring finger protein 43 (RNF43)*, frequentemente encontrados em IPMNs e que podem servir como alvos terapêuticos ou biomarcadores diagnósticos (27).

Atualmente, os desafios do diagnóstico precoce dos tumores do pâncreas são grandes. Devido à relativa baixa frequência destas doenças, o *population-based screening* é impraticável, mas pode ter um papel importante em grupos de doentes com alto risco (predisposição genética, quistos pancreáticos, diabetes e pancreatite crônica) (11,28). É urgente encontrar biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e detecção de recorrências precoces, para orientar no prognóstico e ajudar a selecionar o tratamento adequado. Atualmente, os biomarcadores têm utilidade limitada para detecção em estádios iniciais (29). O antígeno de carboidratos 19.9 (CA 19.9, do inglês *carbohydrate antigen 19.9*) é o biomarcador de cancro do pâncreas mais amplamente validado e o único utilizado na prática clínica, sendo o seu uso limitado devido a falsos negativos e positivos (30,31).

1.3. Alterações moleculares

Cerca de 5–10% dos pacientes com PDAC apresentam mutações germinativas em genes de suscetibilidade conhecidos (32). O desenvolvimento de PDAC é caracterizado pela acumulação de múltiplas alterações genéticas em quatro genes comuns: *KRAS*, *Tumor*

protein 53 (*TP53*), Mothers against decapentaplegic homolog 4 (*SMAD4*) e o Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*) (11,13) (Figura 3).

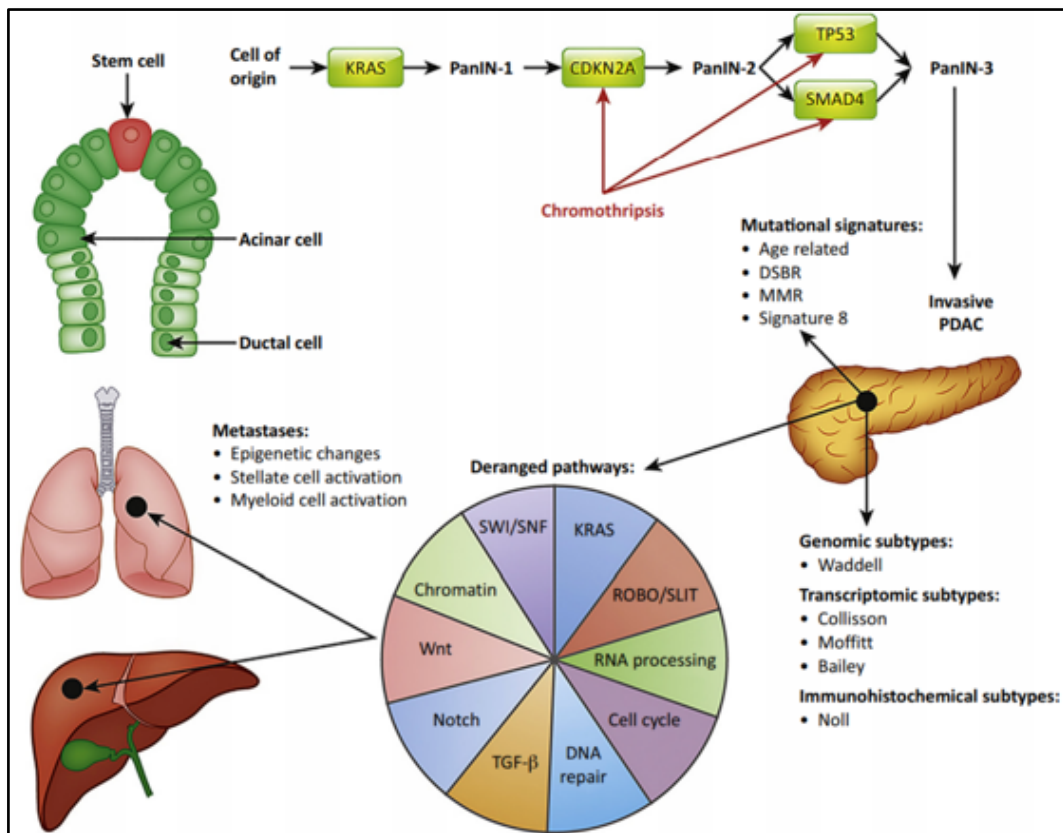


Figura 3 - Progressão molecular do Adenocarcinoma ductal do pancreático. Na imagem está representado a progressão molecular a partir da célula de origem através de lesões precursoras (Neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanINs, do inglês *Pancreatic intraepithelial neoplasia*)) para o carcinoma ductal invasivo. Na região central são apresentadas as principais vias desreguladas ao longo deste processo. No canto inferior esquerdo encontram-se detalhados os locais preferenciais de metastização do adenocarcinoma ductal pancreático (33).

As mutações no gene *KRAS* podem ser um evento precoce. Estas podem também ter potencial prognóstico para o *status* de PDAC e predição de terapia. As modificações *KRAS* em resíduos de Guanina do codão 12 (G12) são as mais frequentes (99%). Além disso, pacientes com baixa expressão de Ácido ribonucleico mensageiro (mRNA, do inglês *Messenger ribonucleic acid*) de *TP53* estão associados com um mau prognóstico e pacientes com expressão regular de *TP53* apresentam um período de sobrevivência livre de progressão mais longo, em comparação com aqueles com perda completa de *TP53*. Por

outro lado, a deleção de *CDKN2A* foi relatada em 50% dos pacientes com PDAC e está associada a uma menor taxa de sobrevivência global. Estudos mostram também que as alterações genéticas do *SMAD4* estão associadas com um mau prognóstico nestes pacientes (11,34,35).

Hayashi e os seus colaboradores detetaram mutações *KRAS*(96%), *CDKN2A*(42%), *TP53* (13%) e *SMAD4* (7%) em doentes com PDAC. Entre os pacientes pós pancreatectomia seguida de quimioterapia, a presença de 0 a 2 genes indutores mutados serviu como um preditor independente de uma melhor sobrevivência global (*Hazard ratio* (HR) 0,20). Isto mostra que o número de genes mutados tem potencial para ser usado como biomarcador prognóstico para PDAC (36).

Para além destas mutações, outros estudos reportaram outras mutações associadas com PDAC (37). Holter *et al*/identificaram mutações de suscetibilidade ao cancro da mama da linhagem germinativa nos genes *Breast cancer associated (BRCA)* tipos 1 e 2 em 4,6% dos pacientes com PDAC com diagnóstico incidental (1% tipo 1 e 3,6% tipo 2). Neste estudo, nenhum dos portadores da mutação atendeu aos critérios de PDAC familiar sugerindo que esses pacientes deveriam ser tratados com esquemas terapêuticos à base de platina (cisplatina) e inibidores da Poli ADP-ribose polimerase (PARP, do inglês *Poly ADP-ribose polymerase*), pois de acordo com a literatura, estão relacionados com o aumento da sobrevivência global. Mutações *BRCA2* também podem ser usadas como biomarcadores preditivos de resposta à quimioterapia (37). Para explorar o espectro de suscetibilidade ao cancro pancreático hereditário, Slavin *et al*/avaliaram o Ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic acid*) da linhagem germinativa de pacientes com PDAC. A análise genética focou-se na identificação de variantes genéticas específicas que poderiam estar associadas a um risco aumentado de desenvolver PDAC hereditário, variantes essas que incluíam mutações em genes conhecidos nomeadamente genes relacionados com a anemia de Fanconi (FA, do inglês *Fanconi anemia*). A FA é conhecida por aumentar o risco de cancro, incluindo cancro pancreático. Foram identificadas variantes genéticas específicas, relacionadas com o aumento do risco para o desenvolvimento de cancro pancreático hereditário. Isto pode ter implicações importantes para estratégias de seleção, aconselhamento genético e intervenções preventivas (38). No estudo, 30% dos doentes tinham uma variante patogénica ou provavelmente patogénica relacionada com a sua predisposição hereditária para o PDAC e 13% tinham mutações em genes associados a

síndromes de cancros conhecidos: Mutações de ataxia telangiectasia, *BRCA2*, *Muts homolog 2 (MSH2)* e *Muts homolog 6 (MSH6)*. Além disso muitos tinham mutações nos genes do complexo de FA, *BRCA2*, Grupo de complementação F de anemia de Fanconi e Grupo de complementação M de anemia de Fanconi (38). A mutação no gene *KRAS* foi também encontrada noutros tipos de lesões do pâncreas e é particularmente prevalente em PDAC e IPMN, contribuindo para a proliferação celular desregulada e a progressão tumoral (39).

1.4. Diagnóstico, estadiamento e monitorização

O diagnóstico, estadiamento e monitorização de lesões pancreáticas tem-se mostrado crucial para melhorar os resultados dos pacientes, permitindo intervenções terapêuticas mais eficazes e potencialmente aumentando a taxa de sobrevivência. A gestão clínica eficaz depende de uma abordagem sistemática que inclua o diagnóstico precoce, o estadiamento preciso e a monitorização contínua, garantindo decisões terapêuticas adequadas e melhores resultados. Entre as principais abordagens estão a biópsia histológica e punção aspirativa, e a biópsia líquida, que desempenham papéis fundamentais na deteção e caracterização de lesões pancreáticas.

1.4.1. Biópsia histológica e punção aspirativa

O diagnóstico e as alterações moleculares relacionadas com o cancro são, normalmente, investigadas usando amostras tumorais obtidas por biópsia/punção aspirativa ou peça cirúrgica. Na maioria dos casos, exceto para tumores ressecáveis, é necessária uma confirmação do diagnóstico. Estas amostras são geralmente obtidas por citologia por agulha fina auxiliada por endoscopia (EUS-FNA, do inglês *endoscopic ultrasound guided – fine needle aspiration*) que tem uma sensibilidade de 75–94% e uma especificidade de 78–95% para cancro do pâncreas (Figura 4) (40).

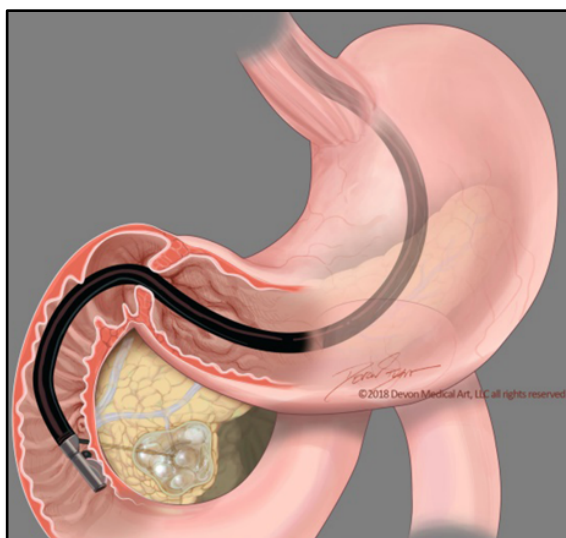


Figura 4 - Biópsia de lesão pancreática obtida por EUS-FNA (40).

Esta técnica pode ser inconclusiva em até 20% dos casos de cancro do pâncreas em estadios inicial, sobretudo por o pâncreas ser um órgão de difícil acesso, mas também pelo tamanho e localização das lesões, necessitando de repetidas biópsias, que apresentam procedimentos invasivos. Além disso, análises realizadas em amostras pequenas não refletem a complexidade do tumor e não podem ser aplicadas à avaliação de sensibilidade aos medicamentos, que pode mudar durante o tratamento devido à evolução do tumor e seleção clonal (41).

Sendo a mutação oncogénica pontual do *KRAS* frequente no PDAC, a identificação desta mutação genética em tecidos pode facilitar o diagnóstico clínico e ter implicações na decisão terapêutica. A combinação desses resultados com a EUS-FNA pode melhorar muito a sensibilidade e a acurácia dos diagnósticos e aumentar o valor preditivo e negativo da citopatologia (de 67 para 88%) (42). A genotipagem realizada em biópsias de tecido é o principal método de classificação de tumores para decisão clínica, mas requer um procedimento invasivo e, portanto, não é usado para orientar o tratamento ao longo do tempo (11).

Além da deteção de mutações *KRAS*, a obtenção de material biológico representa uma oportunidade única para integrar outros biomarcadores. A avaliação da expressão de Ligando de morte programada 1 (PD-L1, do inglês *programmed death-ligand 1*) (43) e a deteção das mutações no gene *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (*BRAF*), nomeadamente a V600E (44) abrem novas possibilidades terapêuticas, principalmente

em pacientes não candidatos a cirurgia inicial. Nos últimos anos, a detecção de mutações *BRCA1/2* tem despertado interesse, pois permite a identificação de casos hereditários (45) e também abre caminho para o uso de inibidores de PARP como terapia personalizada, com resultados promissores (46,47).

Assim, face ao exposto, a integração de dados moleculares é extremamente útil no diagnóstico de lesões do pâncreas e será uma ferramenta valiosa providenciando dados para decisão terapêutica. No entanto tem desvantagens e por isso a necessidade de obtenção de amostras com técnicas menos invasivas. Antes de mais é um procedimento invasivo, exigindo a remoção física de uma amostra de tumor, que pode causar desconforto, dor, e, em alguns casos, complicações como infeções ou hemorragias, que no caso do pâncreas, pode levar a complicações graves, incluindo pancreatite. Além disso, o procedimento geralmente requer sedação ou anestesia, o que implica um tempo de recuperação e possíveis efeitos secundários associados ao uso desses medicamentos (48,49). Outro aspecto limitante é que a biópsia de tecido fornece apenas uma amostra localizada do tumor, o que pode não representar toda a heterogeneidade tumoral. Em tumores com alta variabilidade genética ou molecular uma única amostra pode não ser suficiente para abranger todas as características relevantes. Adicionalmente, realizar uma biópsia de tecido pode ser um processo demorado, desde a colheita da amostra até a sua análise anatomopatológica, além de exigir infraestrutura e recursos adequados para garantir a precisão e a eficácia do procedimento (50).

1.4.2. Biópsia líquida

A biópsia líquida oferece diversas vantagens em comparação com a biópsia de tecido, especialmente na monitorização do cancro, sendo um procedimento menos invasivo pois requer apenas uma amostra de sangue ou outro fluido corporal, o que reduz o risco de complicações como infecção e dor, além de permitir a realização repetida ao longo do tempo para monitorizar continuamente a progressão do tumor e a resposta ao tratamento. Isto é crucial para avaliar a eficácia da terapia e detectar recidivas precocemente (51). Outra vantagem é a capacidade de detectar a heterogeneidade tumoral uma vez que a biópsia líquida pode identificar células tumorais circulantes e fragmentos de DNA tumoral que representam a variabilidade de todo o tumor, algo que a biópsia de tecido não consegue

fazer de forma tão abrangente (52). Adicionalmente possibilita a detecção precoce de recorrência, identificando alterações moleculares antes que sejam detetáveis por métodos de imagem, permitindo assim intervenções terapêuticas mais precoces. Também se destaca em casos de tumores de difícil acesso, como no cancro do pâncreas, onde a biópsia líquida oferece uma alternativa viável para a análise molecular. O tempo de processamento também é mais rápido, acelerando a tomada de decisões, além de permite avaliar a resistência ao tratamento, identificando mutações emergentes e alterações genéticas (53). De acordo com a literatura, a biópsia líquida pode ter aplicação clínica no PDAC nomeadamente na detecção precoce da lesão, no rastreio e diagnóstico, no prognóstico e na resposta à terapia, podendo assim avaliar a progressão da doença (11,17). É também um potencial substituto do tecido para a análise de todo o genoma e para a identificação de biomarcadores em biofluidos, como sangue ou saliva, podendo indicar o estado atual do tumor (54).

1.5. Biomarcadores de muco pancreático

O sangue é considerado a fonte de fluido corporal mais comum para biópsia líquida. No entanto, existem evidências de que o muco pancreático, à semelhança do suco pancreático, poderá representar uma fonte eficaz para a deteteção de PDAC, bem como analisar o conteúdo de lesões mucinosas (55). Kisiel *et al*/relatou que a assinatura de metilação no suco pancreático permite diferenciar PDAC de pancreatite normal ou crónica (55). Yu *et al* realizaram uma análise genética por Sequenciação de nova geração em amostras de sangue periférico de duodeno de pacientes com PDAC e IPMN. Verificaram que a concentração de DNA mutado é significativamente maior em pacientes com PDAC do que com IPMN. Além disso, mutações no *TP53* e/ou *SMAD4* foram comumente detetadas em PDAC e não em IPMN e, em poucos casos, foram detetados no suco pancreático colhido mais de 1 ano antes do diagnóstico de PDAC. Embora a especificidade tenha sido alta (100%), a sensibilidade foi baixa (32%) (56).

As neoplasias quísticas pancreáticas são um grupo heterogéneo com riscos variados de malignidade (57). O antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês *carcinoembryonic antigen*) elevado é um marcador que distingue quistos mucinosos de não mucinosos, mas não malignos de benignos (58). As mutações *GNAS* são encontradas exclusivamente em

IPMN, ou seja, este tipo de mutações é um forte indicador de estarmos perante uma IPMN, mas nem todas as IPMN abrigam mutações *GNAS*(27). É mais frequentemente observada em IPMN intestinal do que nos subtipos não intestinais. Esta mutação no codão 201, geralmente detetada em vários cancros, leva à ativação sustentada de Proteína G estimuladora (*G α s*, do inglês *G protein alpha stimulatory*) e a um aumento do nível de Monofosfato cíclico de adenosina (cAMP, do inglês *cyclic adenosin monofosfato*), que ativa a Proteína quinase A (PKA, do inglês *Protein kinase A*) e as atividades subsequentes de promoção do cancro. As mutações *GNAS* têm potenciais aplicações clínicas nomeadamente na diferenciação de IPMN invasivo de PDAC concomitante usando peças cirúrgicas ressecadas, avaliar a clonalidade de IPMN recorrente no pâncreas remanescente usando amostras dissecadas, e diferenciar lesão quística pancreática usando conteúdo quístico colhido por EUS-FNA (59,60). Foi demonstrado que PDAC concomitante tende a desenvolver-se no pâncreas com IPMN com *GNAS wild-type*, independentemente do subtipo (ducto ramificado ou ducto principal) (59).

Como mencionado anteriormente, o PDAC geralmente exhibe mutações *KRAS*, que são consideradas o principal fator oncológico. Nesse sentido, a deteção de mutações *KRAS* em suco pancreático ou conteúdo quístico poderá ser uma ferramenta valiosa para auxílio no diagnóstico. Também poderá permitir o acompanhamento de lesões quísticas e possível deteção precoce de malignidade, em pacientes sem características preocupantes embora o procedimento de colheita desse fluidos não seja fácil e isenta de riscos (58)

1.6. Objetivos

A deteção de mutações *KRAS* tem um papel crucial na caracterização molecular de neoplasias pancreáticas e pode fornecer informações valiosas para o diagnóstico e implementação terapêutica de pacientes com IPMN do pâncreas. Ao validar a utilização do muco pancreático como uma amostra diagnóstica, este estudo visa oferecer uma abordagem menos invasiva e mais prática em comparação com a biópsia de tecido. Se bem sucedida, esta abordagem pode levar a uma melhoria significativa na precisão diagnóstica e na personalização do tratamento, além de proporcionar uma ferramenta útil para a monitorização contínua da doença.

O objetivo principal deste estudo é validar a detecção de mutações no gene *KRAS* em amostras de muco pancreático como ferramenta preditiva e de apoio à decisão terapêutica em pacientes com IPMN do pâncreas.

Como objetivos específicos pretende-se comparar os resultados da detecção de mutações *KRAS* no muco pancreático com os obtidos em amostras de tecido pancreático utilizando a Reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase chain reaction*) em tempo real e avaliar a concordância dos resultados, explorando a viabilidade do muco pancreático como uma ferramenta diagnóstica menos invasiva.

Deste modo, é possível discutir as implicações clínicas da utilização do muco pancreático como uma amostra alternativa para a detecção de mutações *KRAS*, incluindo potencial para uma monitorização não invasiva e melhoria na tomada de decisão terapêutica.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem

Neste estudo foram incluídos 12 pacientes com diagnóstico clínico e imagiológico de IPMN, submetidos a pancreatemia na Unidade Local de Saúde (ULS) de Coimbra no período de 1 de outubro de 2022 a 31 de março de 2023. Efetuou-se a colheita de muco da lesão quística pancreática e do fragmento fixado em formol e embebido em parafina (FFPE, do inglês *formalin fixed paraffin embedded*) representativo da lesão. A análise das amostras foi feita por PCR em tempo real utilizando o Sistema Biocartis Idylla™, e comparou-se e analisou-se a concordância dos resultados obtidos para os dois tipos de material biológico. Este estudo foi realizado em conformidade com os princípios éticos estabelecidos na Declaração de Helsink, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética da ULS de Coimbra com a denominação de CHUC – 140 – 20. O anonimato dos pacientes foi garantido e todas as informações recolhidas são confidenciais e utilizadas apenas para fins de pesquisa.

2.2. Critérios de inclusão e exclusão do estudo

Os critérios de inclusão e exclusão são fundamentais para garantir a qualidade e relevância dos resultados. Estes critérios determinam quais os indivíduos ou que amostras podem participar na pesquisa, com base em características específicas que atendem aos objetivos do estudo. O uso adequado destes critérios é crucial para garantir a homogeneidade da amostra, reduzir vieses e fortalecer a validade dos resultados, permitindo conclusões mais precisas e relevantes.

2.2.1. Critérios de inclusão no estudo

Os critérios de inclusão neste estudo foram:

- Pacientes com diagnóstico clínico e imagiológico de IPMN;
- Pacientes que apresentaram indicação para cirurgia, submetidos a pancreatemia;
- Pacientes que realizaram a cirurgia no período de 1 de outubro de 2022 e 31 de março de 2023;

- Pacientes com amostras de muco pancreático e fragmentos de tecido FFPE representativo da lesão, colhidos após o procedimento cirúrgico.

2.2.2. Critérios de exclusão no estudo

Os critérios de exclusão neste estudo foram:

- Pacientes sem confirmação clínica e imagiológica de IPMN;
- Pacientes cujas amostras de muco ou fragmentos de tecido FFPE representativo da lesão não foram adequadas para análise;
- Pacientes com histórico de cirurgias anteriores ao pâncreas, devido à possível interferência na integridade das amostras;
- Pacientes com outras doenças graves, como neoplasias malignas concomitantes, que poderiam interferir nos resultados do estudo.

2.3. Processamento do muco pancreático

A colheita do muco pancreático realizou-se em condições de total assépsia, num máximo de 30 minutos após a cirurgia, minimizando, desta forma, os efeitos da isquemia no material genético. Inicialmente a peça cirúrgica foi orientada e preparada segundo o manual de boas práticas em macroscopia e, de seguida, seccionou-se a zona da lesão para facilitar a colheita do muco. Com a ajuda de uma seringa de 5mL, com agulha de 22G, colheu-se o muco da lesão quística pancreática para um tubo de fundo cónico de 15mL, num procedimento que simula a EUS-FNA. A análise da PCR em tempo real foi imediatamente efetuada no muco. Uma amostra foi congelada a -20°C por não ser possível realizar de imediato a análise.

2.4. Preparação e processamento da amostra histológica

A peça de pancreatectomia seguiu o processamento de rotina em Anatomia Patológica e, após a determinação do resultado da análise histopatológica, procedeu-se à seleção de um fragmento FFPE representativo da lesão. A seleção do fragmento e a análise do mesmo, foi feita por um Anatomo-Patologista experiente, bem como a determinação da percentagem

de células tumorais presentes no fragmento representativo da lesão, percentagem essa fundamental para saber a quantidade de material a incluir na análise. Nesta fase é importante controlar os procedimentos padrão quer da fixação em formol a 10% quer de impregnação e inclusão em parafina. As amostras de tecido foram fixadas tão rápido quanto possível depois da remoção cirúrgica e limitou-se os tempos de fixação a um intervalo inferior a 24 horas para reduzir o risco de fragmentação e desaminação do DNA. A impregnação e inclusão em parafina foram feitas a uma temperatura entre 56°C e 60°C, não excedendo 5 horas (61).

Foram utilizadas secções de tecido FFPE com 10 µm. Com base na avaliação histopatológica de secções de tecido FFPE com coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) foram seguidos os seguintes critérios recomendados para a seleção da amostra no Idylla™ KRAS Mutation Test, como mostra a Figura 5.

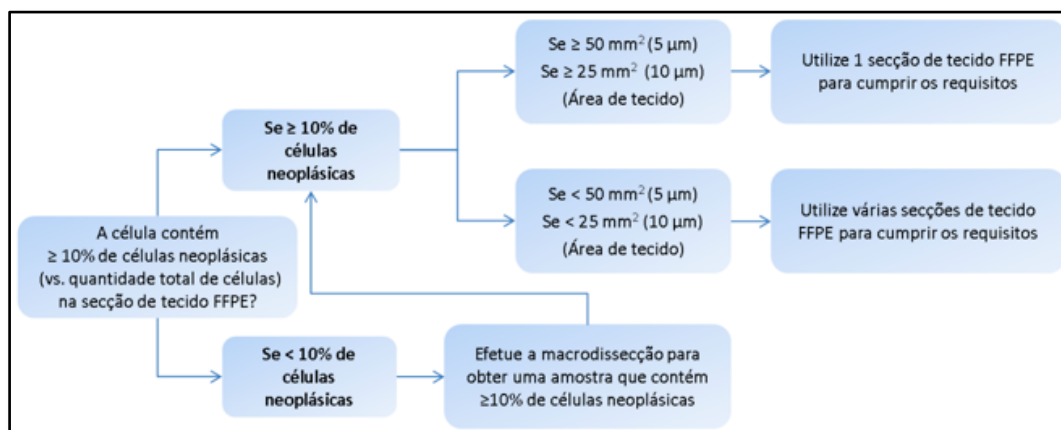


Figura 5 – Critérios recomendados para a seleção da amostra no Idylla™ KRAS Mutation Test. (FFPE, do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*) (62).

Resumindo, se uma amostra tem menos de 10% de células neoplásicas, a macrodissecção tem de ser feita para se obter um conteúdo de pelo menos 10% de células neoplásicas (62). Contudo, a macrodissecção pode ser realizada em todas as amostras a fim de obtermos uma amostra mais rica em células tumorais e consequentemente com maior quantidade de DNA tumoral.

A área da amostra de tecido FFPE deve ser no mínimo de 50mm² quando se utiliza secções de tecido FFPE de 5 µm ou 25mm² quando se utiliza secções de tecido FFPE de 10 µm (62). Para garantir a integridade dos núcleos nas amostras utilizadas recomenda-se a utilização

de secções de tecido FFPE com 10 µm de espessura. Esta espessura é ideal para assegurar que os núcleos permanecem intactos durante a preparação da amostra, o que é crucial para a precisão dos resultados dos testes moleculares (63). Foram utilizadas várias secções de tecido FFPE para cumprir este requisito.

Para efetuar a macrodissecção, utilizou-se um bisturi por amostra para evitar contaminação cruzada entre amostras, bem como uma faca para realizar as secções em microtomia, com limpeza do micrótopo, bancadas, pinças e restante material necessário entre cada amostra.

2.5. PCR em tempo real

A deteção de mutações *KRAS* foi realizada em amostras de muco pancreático e de tecido FFPE, utilizando a metodologia de PCR em tempo real, através do Sistema Biocartis Idylla™. Este sistema compreende todo o processo desde a preparação da amostra, a amplificação em tempo real e a deteção das sequências alvo. O sistema inclui a Idylla™ Console (Figura 6A), uma consola conectada a um ou mais Idylla™ Instruments (Figura 6B). Os Idylla™ Cartridges (Figure 6C) (Cartuchos) concebidos para aplicações específicas, são processados usando um *software* específico, analisando automaticamente os dados obtidos (Figura 6) (62).



Figura 6 – Sistema Biocartis Idylla™. À direita a Idylla™ Console (A) conectada a dois Idylla™ Instruments (B) e à esquerda, um Idylla™ Cartridge (C).

O Idylla™ *ctKRAS* Mutation Assay, está otimizado para 1mL de muco e o Idylla™ *KRAS* Mutation Test para secções de tecido FFPE, libertando DNA para amplificação e deteção subsequente em PCR em tempo real. Ambos os ensaios detetam mutações nos exões 2, 3 e 4 do gene *KRAS*, através de cinco reacções de PCR multiplex concebidas para amplificar especificamente as sequências do gene com mutações nos codões 12, 13, 59, 61, 117 e 146 como mostra a Tabela 1 (62).

Tabela 1 - Mutações *KRAS* detetadas pelo Sistema Biocartis Idylla™ (62).

| Gene | Exão | Codão | Mutação | Alteração dos aminoácidos | Alteração de DNA de codificação | Ligação genética Idylla™ <i>KRAS</i> | |
|--------------------|-------|-------|-------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|------|
| <i>KRAS</i> | 2 | 12 | G12A | p.Gly12Ala | c.35G>C | G12A | |
| | | | G12C | p.Gly12Cys | c.34G>T | G12C | |
| | | | G12D | p.Gly12Asp | c.35G>A | G12D | |
| | | | G12R | p.Gly12Arg | c.34G>C | G12R | |
| | | | G12S | p.Gly12Ser | c.34G>A | G12S | |
| | | | G12V | p.Gly12Val | c.35G>T | G12V | |
| | | 13 | G13D | p.Gly13Asp | c.38G>A | G13D | |
| | | 59 | A59E | p.Ala59Glu | c.176C>A | A59T/E/G | |
| | A59G | | p.Ala59Gly | c.176C>G | | | |
| | A59T | | p.Ala59Thr | c.175G>A | | | |
| | | 3 | 61 | Q61H | p.Gln61His | c.183A>C | Q61H |
| | Q61H | | | p.Gln61His | c.183A>T | | |
| | | | 61 | Q61K | p.Gln61Lys | c.181C>A | Q61K |
| | Q61K | | | p.Gln61Lys | c.180_181delinsAA | | |
| | Q61L | | | p.Gln61Leu | c.182A>T | Q61L/R | |
| | Q61R | | | p.Gln61Arg | c.182A>G | | |
| | | 117 | K117N | p.Lys117Asn | c.351A>C | K117N | |
| | K117N | | p.Lys117Asn | c.351A>T | | | |
| | 4 | 146 | A146P | p.Ala146Pro | c.436G>C | A146P/T/V | |
| A146T | | | p.Ala146Thr | c.436G>A | | | |
| A146V | | | p.Ala146Val | c.437C>T | | | |

A junção do intrão 4 com o exão 5 é amplificada simultaneamente, servindo como controlo do processamento da amostra, que verifica a adequada execução de todo o processo,

desde a preparação da amostra até ao resultado, e está presente em cada uma das cinco PCR multiplex. Além disso, mede também a quantidade de DNA amplificável na amostra e é usado no *status* mutacional da amostra (62).

A análise molecular, embora semelhante nos dois tipos de amostra, apresenta algumas diferenças. No que diz respeito ao processamento da biópsia líquida, após inserção da amostra no cartucho, é adicionado um tampão para criar condições de ligação ao ctDNA. O ctDNA é purificado e concentrado num suporte sólido. Após eluição, os ácidos nucleicos são transferidos para câmaras de PCR (64). Já na análise das secções de tecido FFPE há uma liquefação do tecido e lise celular, que após introdução no cartucho, numa combinação de reagentes químicos, enzimas, calor e ultrassons focados de alta intensidade, induzem a desparafinação, o rompimento do tecido e a lise das células. Os ácidos nucleicos são libertados para uma amplificação de PCR subsequente. Posteriormente, dá-se o PCR em tempo real utilizando primers específicos, em que o DNA é amplificado e as sequências alvo são detetadas por fluorescência. Os reagentes estão presentes numa forma estável e são usados para detetar 21 mutações no gene do *KRAS* já mencionadas (62).

A deteção destes alvos específicos é efetuada com sondas marcadas com fluorescência. Durante a amplificação e deteção, os sinais fluorescentes gerados são posteriormente analisados pelo software. No final é exibido no ecrã da consola o resultado, indicando presença ou ausência de uma mutação específica no gene do *KRAS* da amostra analisada. O software analisa automaticamente os sinais fluorescentes recolhidos que são avaliados em relação à validade da curva de PCR. Um valor do Ciclo de Quantificação (Cq) é calculado para cada curva válida. Os sinais de controlo do processamento (SPC, do inglês processing control signals) da amostra são utilizados para verificar a conclusão adequada do processo da amostra até ao resultado. A presença de mutações genéticas na amostra é determinada pela seguinte fórmula: $\Delta Cq = Cq_{SPC} - Cq_{mutan}$ onde, ΔCq representa a diferença entre Cq_{SPC} (ciclo de quantificação do controle de processamento, que serve como referência) e Cq_{mutan} (ciclo de quantificação do sinal mutante, que indica a presença da mutação). O sinal mutante é considerado detetado se o valor ΔCq estiver dentro de um intervalo predefinido e a amostra será então comunicada como mutação positiva (detetada). O resultado é apresentado no ecrã da consola. Será reportada a ligação genética específica. Todas as amostras com um sinal de controlo válido, mas com um valor de ΔCq fora do

intervalo predefinido para todos os sinais mutantes, são reportados como mutação negativa (não detetada) (62).

2.6. Interpretação dos resultados

O Sistema Biocartis Idylla™ interpreta automaticamente os resultados obtidos e disponibiliza-os para visualização na consola, podendo reportar cinco tipos de resultados possíveis:

- Nenhuma mutação detetada no codão 12, 13, 59, 61, 117, 146 do KRAS (Figura 7A);
- Mutação detetada no codão 12, 13, 59, 61, 117, 146 do *KRAS*. No caso de serem detetadas mais do que uma mutação é reportada pelo equipamento a mutação dominante; Proteína: indica a mutação de acordo com a nomenclatura da *Human Genome Variation Society*; Alteração do nucleótido: indica as alterações de nucleótidos e respectiva posição no gene *KRAS*(Figura 7B);
- Resultado inválido (Figura 7C) (62).

| A | |
|-------------------------|--|
| GENÓTIPO KRAS | NENHUMA MUTAÇÃO DETETADA NO CODÃO 12, 13, 59, 61, 117, 146 DO KRAS |
| B | |
| KRAS GENÓTIPO | MUTAÇÃO DETETADA NO CODÃO 61 DO KRAS |
| Mutação | Q61K |
| Proteína | p.Gln61Lys |
| Alteração de nucleótido | c.181C>A ; c.180_181delinsAA |
| C | |
| GENÓTIPO KRAS | INVÁLIDO |
| Comentário | Repita o teste com um novo cartucho. |

Figura 7 - Tipos de resultados obtidos pelo Sistema Biocartis Idylla™ (62).

2.7. Análise estatística

A análise dos dados clínicos e moleculares dos pacientes foi realizada através de análise estatística descritiva utilizando o *software* Microsoft Excel. Devido ao tamanho reduzido da

amostra, optou-se por este tipo de análise, que permite uma caracterização detalhada das variáveis sem a necessidade de métodos inferenciais mais complexos. O Microsoft Excel, pela sua versatilidade e acessibilidade, foi utilizado como ferramenta adequada para organizar, visualizar e resumir as informações de forma clara e eficiente.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostragem

Os resultados obtidos neste estudo têm por base a análise de mutações *KRAS* por PCR em tempo real, em 24 amostras, das quais 12 são de muco da lesão quística pancreática e 12 de tecido FFPE representativo da lesão, de 12 pacientes com diagnóstico clínico e imagiológico de IPMN do pâncreas.

A distribuição por sexo mostrou uma leve predominância de pacientes do sexo masculino, com 7 homens (58,33%) e 5 mulheres (41,7%) (Figura 8).

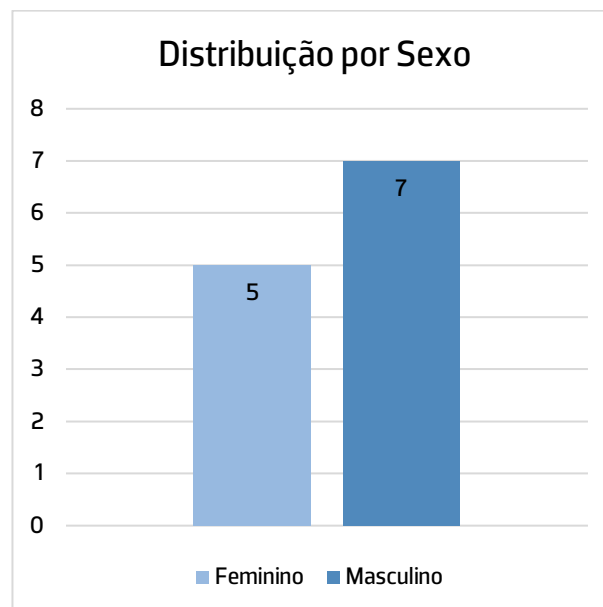


Figura 7 - Representação gráfica da distribuição por sexo.

A idade mínima dos pacientes foi de 48 anos e a máxima de 79 anos, sendo a mediana de idades de 68 anos. A idade foi categorizada com base na média, sendo que 2 pacientes apresentam idade inferior a 61 anos, enquanto 10 tinham idade superior a 61 anos (Figura 9).

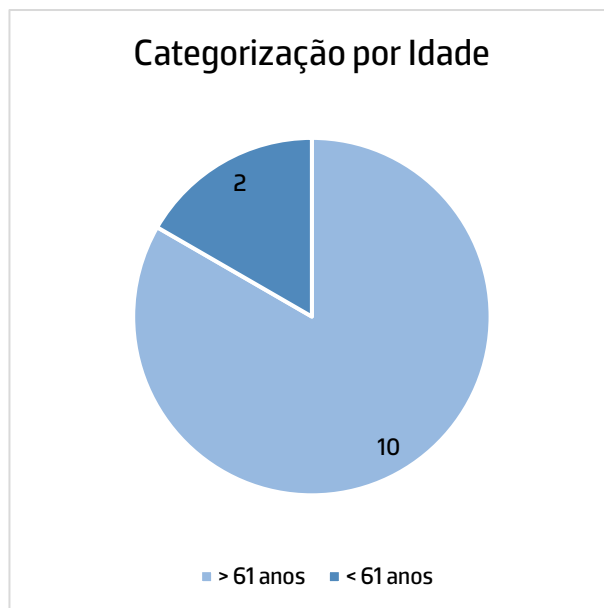


Figura 9 – Representação gráfica da categorização por idade.

O diagnóstico final histopatológico dos pacientes incluiu 5 casos de IPMN, 1 caso de IPMN com foco de PDAC, 1 caso de Neoplasia Mucinoso (NM), 2 casos de PDAC, 2 casos de Quistos simples e 1 caso de Tumor Neuroendócrino (TNE) (Figura 10).

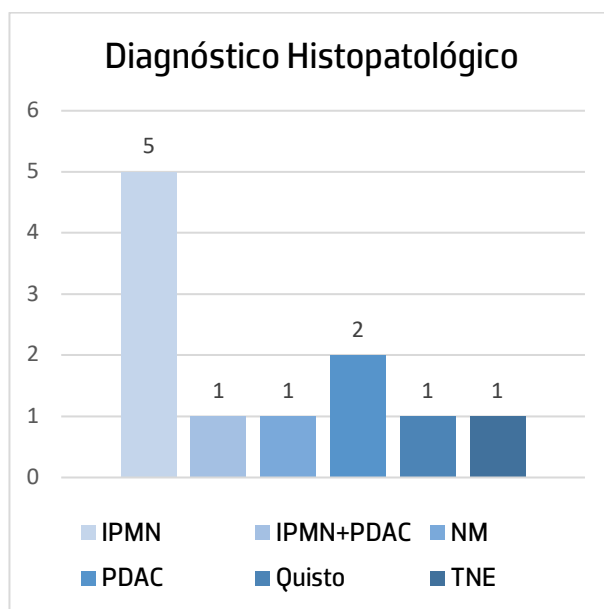


Figura 10 – Representação gráfica do diagnóstico histopatológico. IPMN: Neoplasia mucinosa papilar intraductal; PDAC: Adenocarcinoma ductal pancreático; NM: Neoplasia mucinosa; TNE: Tumor neuroendócrino.

LGD foi observada em 6 amostras, enquanto a HGD foi encontrada em 3 amostras (Figura 11).

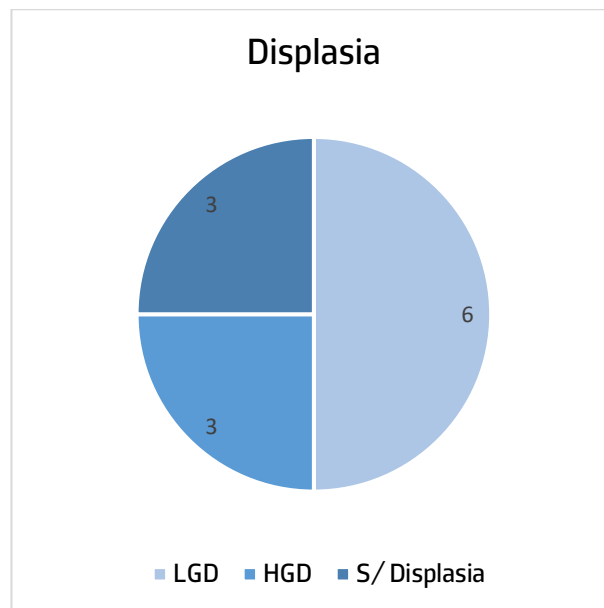


Figura 11 – Representação gráfica do grau de displasia. LGD: Displasia de baixo grau; HGD: Displasia de alto grau.

Em duas amostras não foi detectada qualquer mutação e uma amostra foi inválida.

3.2. Análise mutacional de *KRAS*

A detecção de mutações *KRAS* no muco e tecido pancreático foi realizada por PCR em tempo real utilizando o Sistema Biocartis Idylla™. A presença de mutações *KRAS* foi detectada em 9 das 12 amostras de muco da lesão pancreática (75%) e em 9 das 12 amostras de tecido FFPE da lesão pancreática (75%). Em 2 pacientes (16,7%) não foi detectada qualquer mutação para o gene *KRAS* em ambos os tipos de amostras, muco e tecido. Apenas uma amostra (ID 6) obteve um resultado inválido na análise do muco (8,3%), não tendo sido detectada mutação na análise do tecido (Figura 12).

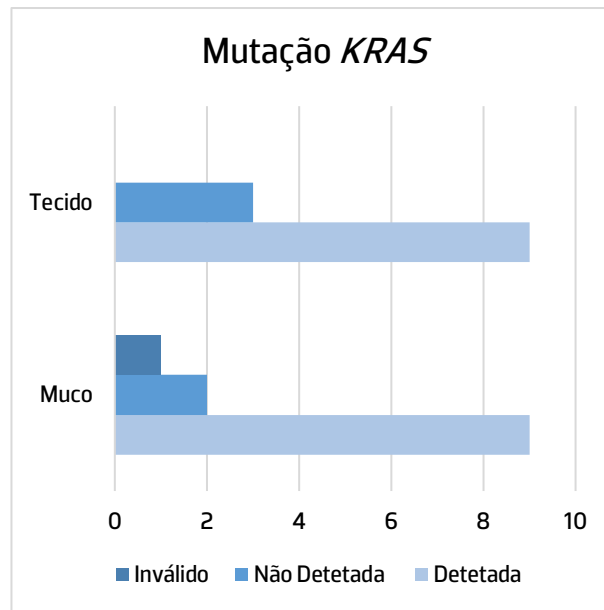


Figura 12 - Representação gráfica do número de mutações *KRAS* detetadas no muco e tecido pancreáticos.

As mutações específicas identificadas incluíram p.Gly12Val (1), p.Gly16His (1), p.Gly12Asp (2), p.Gly13Asp (1), p.Gly12Arg (2), p.Gly12Ala (1) e p.Gln61His (1) (Figura 13).

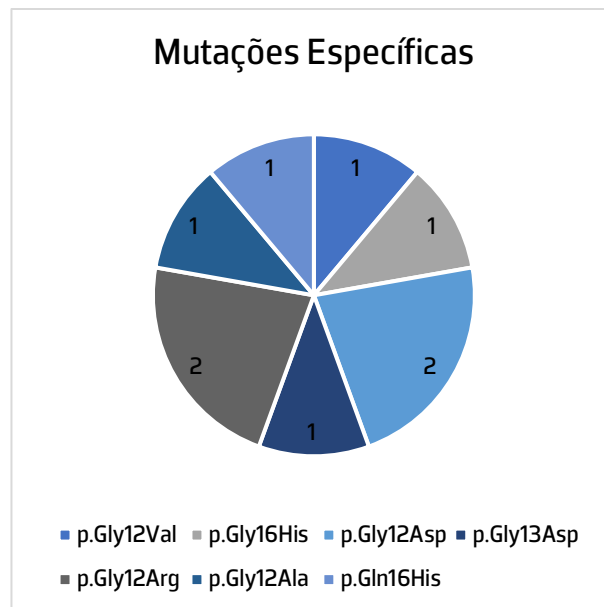


Figura 13 - Representação gráfica das mutações específicas detetadas.

Em suma, sempre que foi possível executar o estudo mutacional no muco, verificou-se concordância de resultado entre o muco e o tecido em 11 das 11 amostras (100%) (Figura 14).

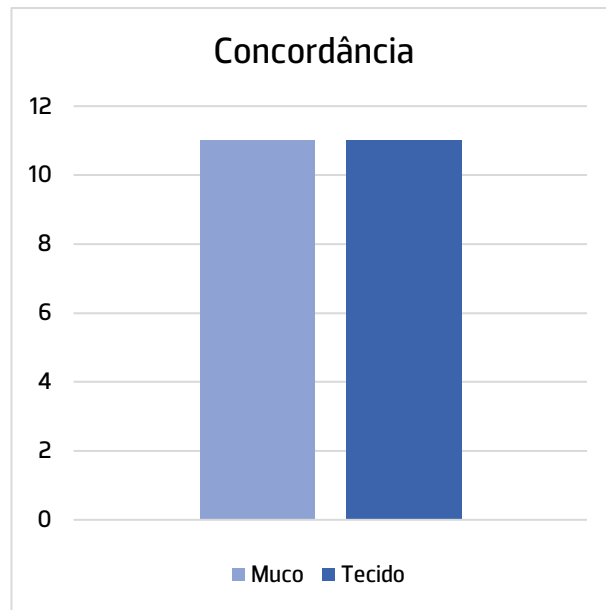


Figura 14 - Representação gráfica da concordância de resultados entre muco e tecido pancreáticos.

4. Discussão

O cancro do pâncreas é uma das neoplasias mais letais no mundo, resultando em taxas de incidência e mortalidade quase idênticas (1). Sintomas inespecíficos e a atual falta de biomarcadores e ferramentas de rastreio dificultam o diagnóstico precoce. As IPMNs são as principais lesões precursoras associadas ao desenvolvimento do cancro pancreático (22), logo a deteção precoce de transformação maligna destas lesões precursoras representa uma oportunidade para o diagnóstico precoce e subseqüentemente melhores resultados.

O aparecimento do uso da biópsia líquida na deteção e monitorização do cancro veio contribuir para uma melhoria no diagnóstico de doenças oncológicas oferecendo uma abordagem menos invasiva, seja para a deteção de cancros em estadios iniciais ou para a monitorização da progressão da doença (65). A deteção de mutações *KRAS* tem um papel crucial na caracterização molecular de neoplasias pancreáticas e pode fornecer informações valiosas para o diagnóstico e progressão da doença em pacientes com IPMN do pâncreas (66).

Assim, o objetivo deste trabalho consistiu na validação de deteção de mutações no gene *KRAS* em amostras de muco pancreático como uma ferramenta preditiva e de apoio à decisão terapêutica em pacientes com IPMN do pâncreas. Para tal foi avaliada a concordância de resultados relativamente ao *status* mutacional de *KRAS* entre o muco da lesão pancreática e o tecido FFPE da lesão pancreática correspondente.

Neste estudo, o Sistema Biocartis Idylla™ foi utilizado para a deteção de mutações *KRAS* em amostras de muco e tecido de 12 pacientes com diagnóstico clínico e imagiológico de IPMN do pâncreas. O desenvolvimento e otimização do protocolo de PCR em Tempo Real para a deteção de mutações *KRAS* no muco pancreático foi bem-sucedido. A utilização do Sistema Biocartis Idylla™ permitiu a deteção rápida e precisa de várias mutações *KRAS* específicas, incluindo p.Gly12Val, p.Gly16His, p.Gly12Asp, p.Gly13Asp, p.Gly12Arg, p.Gly12Ala e p.Gln61His, como descrito por Ischenko e seus colaboradores (67), sendo as mais comuns p.Gly12Asp, p.Gly12Val e p.Gly12Arg no exão 12 e p.Gly13Asp no exão 13, embora esta última menos frequente. Estes resultados estão concordantes com o descrito por Miglio *et al*(14).

À semelhança deste estudo, os dados epidemiológicos destacam uma maior incidência de cancro do pâncreas e, conseqüentemente de lesões precursoras, em homens, principalmente em faixas etárias mais avançadas (2).

A sensibilidade e especificidade do protocolo foram adequadas para a detecção de mutações em ambas as fontes de amostras. De referir que se obteve um resultado inválido na análise do muco da amostra 6, que poderá dever-se a variáveis inerentes à técnica usada como por exemplo uma colocação incorreta da amostra no cartucho, um volume de amostra fora do intervalo, ou, menos provável, motivos relacionados com o Idylla™ Cartridge, como incorreto armazenamento ou utilização fora do período estipulado após a remoção da bolsa (64). Nas restantes amostras, os resultados mostraram que a detecção de mutações *KRAS* no muco pancreático foi concordante com a detecção de mutações *KRAS* no tecido pancreático, confirmando a validade da análise do muco como uma fonte de amostra alternativa, como já havia sido descrito (68). Isto verificou-se também na amostra congelada a -20°C (ID7). Como descrito na literatura, uma congelação a -20°C durante duas semanas (ou a -80°C para armazenamentos mais prolongados), não afetou de qualquer forma a qualidade da amostra bem como os resultados obtidos (69).

Embora o tamanho da amostra seja reduzido, estes achados sugerem que a detecção de mutações *KRAS* em amostras de muco e tecido pode ser uma ferramenta útil na predição do risco de progressão da doença (70). A comparação entre os resultados da detecção de mutações *KRAS* no muco pancreático e no tecido mostrou uma elevada concordância. Este resultado reforça a validade do muco pancreático como uma amostra alternativa confiável para a detecção de mutações *KRAS*, tal como descrito (71), para mutações *KRAS* em PDAC. Explorar a viabilidade do muco pancreático como uma ferramenta diagnóstica menos invasiva revelou várias vantagens significativas. A colheita de muco pancreático é menos dolorosa e menos invasiva do que a biópsia de tecido, o que pode aumentar a aceitação do paciente e permitir uma colheita repetida ao longo do tempo para monitorização contínua. Esta abordagem pode ser particularmente útil para avaliar a resposta ao tratamento e a progressão da doença, proporcionando uma ferramenta valiosa para a tomada de decisões terapêuticas mais informadas e personalizadas, como já havia sido demonstrado (72,73). Tal como descrito na literatura, os resultados do presente estudo têm várias implicações clínicas importantes. A utilização do muco pancreático para a detecção de mutações *KRAS* oferece uma alternativa menos invasiva à biópsia de tecido, permitindo uma recolha mais

fácil e menos dolorosa para o paciente, bem como a recolha repetida permitir a monitorização contínua das mutações *KRAS* ao longo do tempo, proporcionando uma ferramenta útil para avaliar a resposta ao tratamento e a progressão da doença, o que é crucial para ajustes terapêuticos oportunos com já havia sido testado (42). A deteção precisa de mutações *KRAS* pode auxiliar na personalização do tratamento, permitindo intervenções terapêuticas mais direcionadas e potencialmente mais eficazes, baseadas no perfil genético específico do tumor de cada paciente (74). A análise do muco antes da cirurgia permitirá um planeamento preciso e personalizado da intervenção, que, em conjunto com outros métodos diagnósticos, auxiliará na decisão de realizar ou não a cirurgia, desempenhando, as mutações *KRAS*, um papel crucial na determinação da viabilidade da resseção cirúrgica completa, caso seja possível (75).

Além disso, a capacidade de detetar mutações *KRAS* em diferentes tipos de neoplasias pancreáticas pode ajudar a esclarecer a biologia molecular destas doenças, possibilitando a descoberta de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de terapias mais eficazes (76). A implementação de tecnologias como o Sistema Biocartis Idylla™ na prática clínica, pode melhorar significativamente a gestão dos pacientes, proporcionando um diagnóstico mais rápido e preciso, melhorando os desfechos clínicos ao permitir uma intervenção precoce e personalizada (63). A deteção de mutações *KRAS* em diferentes tipos de neoplasias pancreáticas, incluindo IPMN e PDAC também sugere que este método pode ser aplicável a uma variedade de diagnósticos, aumentando a sua utilidade clínica (63).

Assim sendo, este estudo destaca o potencial da deteção de mutações *KRAS* em muco pancreático como uma ferramenta diagnóstica valiosa e menos invasiva, que pode complementar ou, em alguns casos, substituir a biópsia de tecido. A alta taxa de concordância entre as deteções de *KRAS* no muco e no tecido confirma a viabilidade desta abordagem, enquanto as implicações clínicas sugerem que ela pode melhorar significativamente a gestão e o prognóstico dos pacientes com neoplasias pancreáticas. Ao realizar a colheita de muco antes da cirurgia e subsequentemente, avaliar a presença de mutações *KRAS*, será possível avaliar o risco de progressão da doença e determinar a abordagem mais adequada para cada paciente, podendo optar-se por uma intervenção cirúrgica mais agressiva ou considerar uma abordagem mais conservadora, evitando uma cirurgia desnecessária. Desta forma, a análise do muco pancreático antes da cirurgia

permite um planeamento mais preciso e personalizado da intervenção, aumentando a eficácia do tratamento e potencialmente melhorando o prognóstico do paciente.

Embora os resultados sejam promissores, algumas limitações devem ser consideradas. Este estudo incluiu um número relativamente pequeno de amostras, sendo necessário realizar estudos com um número maior de pacientes para confirmar estes achados e determinar se a deteção de mutações *KRAS* em muco e tecido pancreático pode ser utilizada como uma ferramenta de decisão terapêutica na gestão clínica de pacientes com IPMN do pâncreas. Além disso, o estudo incluiu apenas pacientes submetidos a cirurgia, o que pode introduzir um viés de seleção. Esta abordagem exclui pacientes com IPMN que não são candidatos cirúrgicos, limitando a aplicabilidade dos resultados a uma população específica de pacientes com indicação cirúrgica. Outro ponto crítico é que a coorte foi composta por doentes diagnosticados clínica e imagiológicamente com IPMN, mas posteriormente nem todos apresentaram IPMN confirmado histologicamente. Isso reflete a dificuldade do diagnóstico imagiológico isolado e pode afetar a precisão dos resultados, uma vez que o estudo incluiu uma mistura de diferentes condições pancreáticas, diluindo a especificidade dos achados para IPMN. Apesar da alta concordância observada, é importante considerar a possibilidade de mutações adicionais que não foram detetadas com o método utilizado. Expandir o painel de mutações analisadas para incluir outras alterações genéticas relevantes e conduzir estudos longitudinais para avaliar a eficácia do muco pancreático na monitorização contínua das mutações *KRAS*.

Por fim, trata-se de um estudo unicêntrico, realizado em uma única instituição, o que pode introduzir vieses relacionados com a prática clínica local, com a experiência da equipa e com os protocolos específicos da instituição. Estudos multicêntricos são necessários para validar os resultados em diferentes populações e configurações clínicas.

5. Conclusão

Este estudo sugere a utilidade clínica da detecção de mutações *KRAS* em muco pancreático como uma ferramenta preditiva e de apoio à decisão terapêutica em pacientes com IPMN e PDAC. A alta taxa de concordância com os resultados de tecido FFPE confirma a viabilidade desta abordagem. A implementação de tecnologias como o Sistema Biocartis Idylla™ na prática clínica pode melhorar significativamente o diagnóstico e a monitorização dos pacientes, proporcionando um diagnóstico mais rápido e preciso e permitindo intervenções terapêuticas mais personalizadas e eficazes. Para confirmar estes achados e explorar plenamente o potencial desta técnica, são necessários estudos adicionais, prospetivos e multicêntricos.

6. Referências Bibliográficas

1. <https://gco.iarc.fr/en>. GLOBOCAN.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3).
3. Carrera S, Sancho A, Azkona E, Azkuna J, Lopez-Vivanco G. Hereditary pancreatic cancer: Related syndromes and clinical perspective. Vol. 15, *Hereditary Cancer in Clinical Practice.* 2017.
4. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: A review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg.* 2008;393(4).
5. Pothuraju R, Rachagani S, Junker WM, Chaudhary S, Saraswathi V, Kaur S, et al. Pancreatic cancer associated with obesity and diabetes: An alternative approach for its targeting. Vol. 37, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2018.
6. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol.* 2019;10(1).
7. <https://www.cancer.org/cancer/types/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.
8. Nai Q, Luo H, Zhang P, Hossain MA, Gu P, Sidhom IW, et al. How early can pancreatic cancer be recognized? A case report and review of the literature. *Case Rep Oncol.* 2015;8(1).
9. Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. Vol. 18, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.* 2021.
10. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. In: *The Lancet.* 2011.
11. Kaczor-Urbanowicz KE, Cheng J, King JC, Sedarat A, Pandol SJ, Farrell JJ, et al. Reviews on Current Liquid Biopsy for Detection and Management of Pancreatic Cancers. Vol. 49, *Pancreas.* 2020.
12. Kriz D, Ansari D, Andersson R. Potential biomarkers for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. Vol. 22, *Clinical and Translational Oncology.* 2020.
13. Liu DSK, Mato Prado M, Giovannetti E, Jiao LR, Krell J, Frampton AE. Can circulating tumor and exosomal nucleic acids act as biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma? Vol. 19, *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2019.
14. Miglio U, Oldani A, Mezzapelle R, Veggiani C, Paganotti A, Garavoglia M, et al. KRAS mutational analysis in ductal adenocarcinoma of the pancreas and its clinical significance. *Pathol Res Pract.* 2014;210(5).
15. Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. Vol. 163, *Gastroenterology.* 2022.
16. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. Vol. 326, *JAMA – Journal of the American Medical Association.* 2021.
17. Bernard V, Kim DU, San Lucas FA, Castillo J, Allenson K, Mulu FC, et al. Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology.* 2019;156(1).
18. Matsubayashi H, Takaori K, Morizane C, Maguchi H, Mizuma M, Takahashi H, et al. Familial pancreatic cancer: Concept, management and issues. Vol. 23, *World Journal of Gastroenterology.* 2017.

19. Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJA, et al. Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Res.* 2004;64(7).
20. Goggins M, Overbeek KA, Brand R, Syngal S, Del Chiaro M, Bartsch DK, et al. Management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer: updated recommendations from the International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium. Vol. 69, *Gut.* 2020.
21. Kodiatte TA, Burad D, Rymbai ML. Clinicopathological features of intraductal papillary mucinous neoplasms of pancreas in a tertiary care center: A 14 year retrospective study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2016;10(8).
22. Tanaka M, Fernández-Del Castillo C, Adsay V, Chari S, Falconi M, Jang JY, et al. International consensus guidelines 2012 for the management of IPMN and MCN of the pancreas. In: *Pancreatology.* 2012.
23. Furukawa T, Klöppel G, Volkan Adsay N, Albores-Saavedra J, Fukushima N, Horii A, et al. Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: A consensus study. *Virchows Archiv.* 2005;447(5).
24. Triantopoulou C, Gourtsoyianni S, Karakaxas D, Delis S. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: A Challenging Diagnosis. Vol. 13, *Diagnostics.* 2023.
25. Oliveira RC, Cipriano MA. Intraductal papillary mucinous neoplasia of the pancreas – Pathologic features and molecular markers – A review. *Surgery, Gastroenterology and Oncology.* 2019;24(6).
26. Salvia R, Fernández-Del Castillo C, Bassi C, Thayer SP, Falconi M, Mantovani W, et al. Main-Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas: Clinical Predictors of Malignancy and Long-term Survival Following Resection. *Ann Surg.* 2004;239(5).
27. Wu J, Matthaei H, Maitra A, Dal Molin M, Wood LD, Eshleman JR, et al. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med.* 2011;3(92).
28. Zhang W, Ji L, Wang X, Zhu S, Luo J, Zhang Y, et al. Nomogram Predicts Risk and Prognostic Factors for Bone Metastasis of Pancreatic Cancer: A Population-Based Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;12.
29. Capello M, Bantis LE, Scelo G, Zhao Y, Li P, Dhillon DS, et al. Sequential validation of blood-based protein biomarker candidates for early-stage pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(4).
30. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(2).
31. Fahrmann JF, Schmidt CM, Mao X, Irajizad E, Loftus M, Zhang J, et al. Lead-Time Trajectory of CA19-9 as an Anchor Marker for Pancreatic Cancer Early Detection. *Gastroenterology.* 2021;160(4).
32. Maitra A, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20(2).
33. Oldfield LE, Connor AA, Gallinger S. Molecular Events in the Natural History of Pancreatic Cancer. Vol. 3, *Trends in Cancer.* 2017.
34. Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.* 2015;518(7540).

35. Xia X, Wu W, Huang C, Cen G, Jiang T, Cao J, et al. SMAD4 and its role in pancreatic cancer. Vol. 36, *Tumor Biology*. 2015.
36. Hayashi H, Kohno T, Ueno H, Hiraoka N, Kondo S, Saito M, et al. Utility of assessing the number of mutated KRAS, CDKN2A, TP53, and SMAD4 genes using a targeted deep sequencing assay as a prognostic biomarker for pancreatic cancer. *Pancreas*. 2017;46(3).
37. Holter S, Borgida A, Dodd A, Grant R, Semotiuk K, Hedley D, et al. Germline BRCA mutations in a large clinic-based cohort of patients with pancreatic adenocarcinoma. In: *Journal of Clinical Oncology*. 2015.
38. Slavin TP, Neuhausen SL, Nehoray B, Niell-Swiller M, Solomon I, Rybak C, et al. The spectrum of genetic variants in hereditary pancreatic cancer includes Fanconi anemia genes. *Fam Cancer*. 2018;17(2).
39. Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, Della Peruta M, et al. Pancreatic endocrine tumors: Expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(2).
40. Moyer MT, Maranki JL, DeWitt JM. EUS-Guided Pancreatic Cyst Ablation: a Clinical and Technical Review. Vol. 21, *Current Gastroenterology Reports*. 2019.
41. Rofi E, Vivaldi C, Del Re M, Arrigoni E, Crucitta S, Funel N, et al. The emerging role of liquid biopsy in diagnosis, prognosis and treatment monitoring of pancreatic cancer. Vol. 20, *Pharmacogenomics*. 2019.
42. Buscail E, Maulat C, Muscari F, Chiche L, Cordelier P, Dabernat S, et al. Liquid biopsy approach for pancreatic ductal adenocarcinoma. Vol. 11, *Cancers*. 2019.
43. Rahn S, Krüger S, Mennrich R, Goebel L, Wesch D, Oberg HH, et al. POLE Score: A comprehensive profiling of programmed death 1 ligand 1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2019;10(16).
44. Hendifar A, Blais EM, Wolpin B, Subbiah V, Collisson E, Singh I, et al. Retrospective Case Series Analysis of RAF Family Alterations in Pancreatic Cancer: Real-World Outcomes From Targeted and Standard Therapies. *JCO Precis Oncol*. 2021;(5).
45. Blair AB, Groot VP, Gemenetzis G, Wei J, Cameron JL, Weiss MJ, et al. BRCA1/BRCA2 Germline Mutation Carriers and Sporadic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Am Coll Surg*. 2018;226(4).
46. Kowalewski A, Szyłberg Ł, Saganek M, Napiontek W, Antosik P, Grzanka D. Emerging strategies in BRCA-positive pancreatic cancer. Vol. 144, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2018.
47. Wong W, Raufi AG, Safyan RA, Bates SE, Manji GA. Brca mutations in pancreas cancer: Spectrum, current management, challenges and future prospects. Vol. 12, *Cancer Management and Research*. 2020.
48. Klaiber U, Hackert T, Neoptolemos JP. Adjuvant treatment for pancreatic cancer. Vol. 4, *Translational Gastroenterology and Hepatology*. 2019.
49. Hackert T, Büchler MW, Werner J. Surgical options in the management of pancreatic cancer. *Minerva Chir*. 2009;64(5).
50. Ohta R, Yamada T, Sonoda H, Matsuda A, Shinji S, Takahashi G, et al. Detection of KRAS mutations in circulating tumour DNA from plasma and urine of patients with colorectal cancer. *European Journal of Surgical Oncology*. 2021;47(12).
51. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Vol. 14, *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017.

52. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. Vol. 17, *Nature Reviews Cancer*. 2017.
53. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224).
54. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. Vol. 32, *Journal of Clinical Oncology*. 2014.
55. Kisiel JB, Raimondo M, Taylor WR, Yab TC, Mahoney WD, Sun Z, et al. New DNA methylation markers for pancreatic cancer: Discovery, tissue validation, and pilot testing in pancreatic juice. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(19).
56. Yu J, Sadakari Y, Shindo K, Suenaga M, Brant A, Navarro Almario JA, et al. Digital next-generation sequencing identifies low-abundance mutations in pancreatic juice samples collected from the duodenum of patients with pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Gut*. 2017;66(9).
57. Hata T, Mizuma M, Motoi F, Omori Y, Ishida M, Nakagawa K, et al. GNAS mutation detection in circulating cell-free DNA is a specific predictor for intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas, especially for intestinal subtype. *Sci Rep*. 2020;10(1).
58. Tanaka M, Fernández-del Castillo C, Kamisawa T, Jang JY, Levy P, Ohtsuka T, et al. Revisions of international consensus Fukuoka guidelines for the management of IPMN of the pancreas. Vol. 17, *Pancreatology*. 2017.
59. Matthaei H, Wu J, Dal Molin M, Debeljak M, Lingohr P, Katabi N, et al. GNAS codon 201 mutations are uncommon in intraductal papillary neoplasms of the bile duct. *HPB*. 2012;14(10).
60. Matthaei H, Wu J, Dal Molin M, Shi C, Perner S, Kristiansen G, et al. GNAS sequencing identifies IPMN-specific mutations in a subgroup of diminutive pancreatic cysts referred to as "Incipient IPMNs." *American Journal of Surgical Pathology*. 2014;38(3).
61. Malatesta M. *Histological and Histochemical Methods - Theory and practice*. *European Journal of Histochemistry*. 2016;60(1).
62. Instruções de utilização Idylla™ KRAS Mutation Test [Internet]. Available from: www.biocartis.com
63. Wheeldon L, Jones M, Probyn B, Shetty D, Garvican J. Use of the Biocartis Idylla™ Platform for the Detection of Epidermal Growth Factor Receptor, BRAF and KRAS Proto-Oncogene Mutations in Liquid-Based Cytology Specimens from Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma and Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of Molecular Pathology*. 2022;3(2).
64. Idylla™ ctKRAS Mutation Assay [Internet]. 2017. Available from: www.biocartis.com
65. Alix-Panabières C, Marchetti D, Lang JE. Liquid biopsy: from concept to clinical application. Vol. 13, *Scientific Reports*. 2023.
66. Ardalan B, Ciner A, Baca Y, Darabi S, Kasi A, Lou E, et al. Prognostic indicators of KRAS G12X mutations in pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(4_suppl).
67. Ischenko I, D'Amico S, Rao M, Li J, Hayman MJ, Powers S, et al. KRAS drives immune evasion in a genetic model of pancreatic cancer. *Nat Commun*. 2021;12(1).
68. Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. Vol. 17, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2020.

69. van Huijgevoort NCM, Halfwerk HBG, Lekkerkerker SJ, Reinten RJ, Ramp F, Fockens P, et al. Detecting KRAS mutations in pancreatic cystic neoplasms: droplet digital PCR versus targeted next-generation sequencing. Vol. 25, HPB. 2023.
70. Perdomo Zaldivar E, Inga E, Cano T, Gómez M, Toledano Fonseca M, Saavedra Garcia G, et al. K-Ras mutation in liquid biopsy and tumor tissue correlation in patients with pancreatic cancer. *Annals of Oncology*. 2019;30.
71. Choi MH, Mejlænder-Andersen E, Manueldas S, El Jellas K, Steine SJ, Tjensvoll K, et al. Mutation analysis by deep sequencing of pancreatic juice from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2019;19(1).
72. Tonelli C, Yordanov GN, Hao Y, Deschênes A, Hinds J, Belleau P, et al. A mucus production programme promotes classical pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*. 2024;73(6).
73. Perets R, Greenberg O, Shentzer T, Semenisty V, Epelbaum R, Bick T, et al. Mutant KRAS Circulating Tumor DNA Is an Accurate Tool for Pancreatic Cancer Monitoring. *Oncologist*. 2018;23(5).
74. Domagała P, Hybiak J, Sulzyc-Bielicka V, Cybulski C, Ryś J, Domagała W. KRAS mutation testing in colorectal cancer as an example of the pathologist's role in personalized targeted therapy: A practical approach. Vol. 63, *Polish Journal of Pathology*. 2012.
75. Li SY, Wang ZJ, Pan CY, Wu C, Li ZS, Jin ZD, et al. Comparative Performance of Endoscopic Ultrasound-Based Techniques in Patients With Pancreatic Cystic Lesions: A Network Meta-Analysis. Vol. 118, *American Journal of Gastroenterology*. 2023.
76. Luo J. KRAS mutation in pancreatic cancer. Vol. 48, *Seminars in Oncology*. 2021.