

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS POR
TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA EM ADENOCARCINOMA DE
PÂNCREAS: INFLUÊNCIA EPIGENÉTICA NA CARCINOGENESE**

CAMILA NÓBREGA JULIANO

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS POR
TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA EM ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS:
INFLUÊNCIA EPIGENÉTICA NA CARCINOGENESE**

CAMILA NÓBREGA JULIANO

Orientador: Maria Isabel Albano
Edelweiss

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Mestre

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Juliano, Camila Nóbrega
AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE ACETILAÇÃO DAS HISTONAS
POR TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA EM ADENOCARCINOMA DE
PÂNCREAS: INFLUÊNCIA EPIGENÉTICA NA CARCINOGENESE /
Camila Nóbrega Juliano. -- 2012.
94 f.

Orientadora: Maria Isabel Albano Edelweiss.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Histonas. 2. acetilação-histonas. 3. câncer de
pâncreas e histonas. 4. imunohistoquímica. I.
Edelweiss, Maria Isabel Albano, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus avós, Lorena Luiza Varela Juliano e Ivo Nóbrega, que por uma triste ironia nos deixaram acometidos por esta neoplasia; agradeço pelos bons momentos de alegria compartilhados e pela família maravilhosa que construíram, saudades sempre...

Agradecimentos

Ao final de mais uma jornada, agradeço a todos aqueles que me ajudaram, incentivaram, de perto ou longe, em pensamento ou momento presente, muitas vezes apenas mentalizando um pensamento positivo de sucesso; aqueles que vibraram comigo ao longo dessa jornada, muito obrigada!

Agradecimento especial aos meus pais, Leila e Renan, que nunca mediram esforços para me dar a melhor educação possível e sempre me incentivaram a seguir em frente na minha trajetória profissional; aos meus irmãos, Lú, Andréa, Júnior e Thiago pelo carinho, apoio e experiências compartilhadas.

À minha irmã Andréa pela boa vontade e dedicação em corrigir a redação deste trabalho, e pelo enriquecimento com as suas sugestões sempre adequadas.

Agradecimento com todo o amor do mundo ao meu marido, Bruno, pela paciência, compreensão nos momentos difíceis, pelo incentivo na hora que o desânimo batia e pelo conforto de todas as horas.

Aos meus amigos verdadeiros e à minha família enorme de Rio Grande, Florianópolis e Blumenau, que se não fossem os momentos de descontração que juntos passamos, essa jornada teria sido bem mais difícil.

À minha Orientadora Professora Doutora Maria Isabel Albano Edelweiss, pelo incentivo em iniciar esta jornada, por ter me aceitado como sua orientanda, sempre disposta a me ajudar em todas as horas e pela amizade firmada ao longo desses dois anos.

Agradecimento especial aos meus colegas e ex-colegas da Residência Médica do HCPA, que tornaram-se meus amigos, pois sem o apoio e a ajuda deles nas horas em que eu precisei eu não teria chegado ao fim.

À minha colega, parceira de todas as horas e amiga Márcia Pithan, que iniciou essa jornada comigo e que muitas e muitas vezes ouviu meus “desatinos” e me ajudou a seguir em frente.

Agradecimento também imenso a Patrícia Izetti, Médica do Laboratório de Medicina Genômica e Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética de Biologia Molecular da UFRGS, pelo imenso conhecimento compartilhado, dedicação incondicional, sempre com bom-humor disposta a ajudar desde o início do projeto, pela redação e revisão do artigo, sem ela esse trabalho não teria se concretizado.

À Dra. Patrícia Ashton-Prolla, Médica do Serviço de Genética Médica e do Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo imenso conhecimento compartilhado, incentivo e ajuda desde o início do projeto.

Ao Dr. Alessandro Bersch Osvaldt, Médico do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Grupo de Vias Biliares e Pâncreas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e dedicação incondicional a este trabalho.

Aos bolsistas, Alex Pritzel dos Santos e Charles Pedro Bravosi que ajudaram na coleta dos dados.

A Vania Hirakata e Daniela Benzano pela ajuda na análise estatística.

Ao serviço de Patologia do Hospital de Clínicas pela disponibilidade de acesso aos materiais, aos professores e contratados que contribuíram com seu conhecimento e experiência, pela amizade ao longo desses anos e aos funcionários que me ajudaram na busca dos materiais, em especial a funcionária Zeli.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela estrutura e empenho de proporcionar aos alunos uma oportunidade de qualificação em uma universidade respeitada.

“O UNIVERSO TRABALHA EM SEU FAVOR E COLOCOU EM SEU
ESPÍRITO TUDO O QUE VOCÊ PRECISA PARA SER VENCEDOR EM
TODAS AS ÁREAS DE SUA VIDA”

Zibia Gaspareto

RESUMO

Introdução: O Adenocarcinoma ductal pancreático é um tumor bastante agressivo que apresenta uma alta de letalidade e, para o qual, poucas opções terapêuticas estão disponíveis. Isto pode ser parcialmente explicado pela complexidade derivada de múltiplas aberrações genéticas e da população celular mista presente em um tumor pancreático, o que também pode explicar o curso clínico heterogêneo observado na prática diária. Ultimamente, pesquisas científicas têm contribuído para ampliar o conhecimento sobre o impacto das alterações epigenéticas no desenvolvimento de múltiplos tipos de câncer, porém no pâncreas essas alterações ainda são incertas e, por isso, foco de investigação. A desregulação epigenética parece estar envolvida no ciclo celular da célula tumoral, incluindo o crescimento celular, diferenciação, progressão tumoral e morte celular, e a acetilação das histonas é um importante mecanismo que regula a transcrição de genes envolvidos nesses processos. Padrões globais de modificações das histonas foram recentemente apontados como preditores de desfecho em pacientes com câncer, mas poucos estudos têm sido realizados nesta área, inclusive em Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP).

Objetivos: O presente estudo foi desenvolvido a fim de investigar o padrão de modificação de acetilação das histonas em adenocarcinoma pancreático, através da análise imunohistoquímica.

Materiais e métodos: Uma análise clinicopatológica retrospectiva foi realizada em 119 pacientes diagnosticados com câncer de pâncreas entre os anos de 2005 e 2011, e realizado estudo imunohistoquímico com os anticorpos

contra H4K12ac, H3K9ac e H3K18ac. Marcação nuclear positiva para cada histona foi medida quanto à intensidade e expressão, sendo classificadas em grupos de baixa ou de alta intensidade/expressão. Os resultados foram analisados em relação aos parâmetros clinicopatológicos de cada paciente.

Resultados: Houve uma relação positiva entre diferenciação tumoral e alta expressão de H4K12ac ($P < 0,05$), bem como a intensidade forte dos três marcadores correlacionou-se positivamente com o estágio do tumor ($P < 0,01$). Análise univariada mostrou pior sobrevida em pacientes com níveis elevados de expressão de H4K12ac ($p = 0,038$) e H3K18Ac ($P = 0,033$). Modelo de risco proporcional de Cox revelou o efeito prognóstico independente de níveis elevados de H4K12ac H3K18ac (taxas de risco de 1,6 e 1,7, respectivamente, $p < 0,05$), especialmente para pacientes em estágios iniciais.

Sugerimos como hipótese que as modificações na acetilação das histonas H4K12 e H3K18 podem ser consideradas fatores prognósticos importantes para o câncer de pâncreas, embora o mecanismo envolvido necessite de mais investigação. Aumentando a compreensão e o conhecimento sobre o padrão de acetilação das histonas, poder-se-ão finalmente gerar novas idéias para um diagnóstico molecular racional e novas abordagens terapêuticas.

Descritores: Histonas; acetilação-histonas; câncer de pâncreas e histonas; imunohistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Ductal pancreatic adenocarcinoma (DPAs) is a highly aggressive tumor, with a high lethality rate, for which few therapeutic options are available. This may be partially explained by the notorious complexity derived from the multiple genetic aberrations and mixed cellular population present in a pancreatic tumor, which can also explain the heterogeneous clinical course observed in daily practice. Lately, there is an increase in the literature about the impact of epigenetic changes on the development of several cancer, however in the pancreas these changes are still uncertain. Epigenetic deregulation may be involved in tumor cell biology, including cell growth, differentiation, tumor progression and cell death, and histone acetylation is a major mechanism that regulates gene transcription. Patterns of global histone modifications have been recently suggested as outcome predictors in cancer patients, but few studies have been conducted on pancreatic ductal adenocarcinomas.

Objectives: This study was designed to investigate the predictive value of histone acetylation modifications on pancreatic cancer.

Material and methods: A retrospective clinicopathologic analysis was undertaken in 119 patients diagnosed with PDAC between 2005 and 2011, and immunohistochemistry performed with antibodies against H4K12ac, H3K9ac and H3K18ac. Positive nuclear staining for each histone was measured as the intensity and expression, being classified into low or high-staining groups. Results were analyzed in relation to patients' clinicopathologic parameters.

Results: There was a positive relationship between tumor differentiation and H4K12ac high scores ($P < 0.05$) and staining of the three markers correlated positively with tumor stage ($P < 0.01$). Univariate analysis showed worse survival in patients with high detection levels of H4K12ac ($p = 0.038$) and H3K18Ac ($P = 0.033$). A backwards Cox proportional hazards model revealed the independent prognostic effect of high H4K12ac and H3K18ac levels (hazard ratios of 1.6 and 1.7 respectively, $p < 0.05$), especially for patients at early stages. We hypothesize that acetylation of H4K12 and H3K18 may be considered valuable prognostic factors for pancreatic cancer, although the mechanism involved needs further investigation. Increasing insights into histone acetylation modifications can ultimately generate new ideas for rationally and molecularly based diagnostic and therapeutic approaches.

Key-words: Histone; histone-acetylation; pancreatic cancer and histone; immunohistochemistry

Lista de Tabelas

Tabela 1. Categorias de risco associadas ao Adenocarcinoma de pâncreas...22

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo de progressão do Adenocarcinoma pancreático.....	26
Figura 2. Modificações das histonas associadas à transcrição da heterocromatina para eucromatina.....	34
Figura 3. Estrutura do nucleossomo.....	36
Figura 4. Ação das histonas acetilases (HAT) e histonas-desacetilases (HDAC).....	38
Figura 5. Alteração no posicionamento do nucleossomo de acordo com as modificações nas histonas.....	39

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenocarcinoma ductal pancreático
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HAT	Histona acetil-transferase
HDAC	Histona desacetilase
iHDAC	Inibidores das Histonas desacetilases
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NIPan	Neoplasia Intra-epitelial Pancreática
RNA	Ácido ribonucleico
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
TSA	Trichostatin A

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1.	CÂNCER DE PÂNCREAS.....	20
2.1.1.	Fatores de risco	20
2.1.2.	Epidemiologia.....	23
2.1.3.	Modelo de progressão do Adenocarcinoma Ductal Pancreático e Alterações Moleculares.....	25
2.2.	MECANISMOS EPIGENÉTICOS	30
2.2.1.	Modificações nas histonas	35
2.2.2.	Perspectivas futuras: Inibidores das Histonas-desacetilases (iHDAC)	43
3	OBJETIVOS.....	47
3.1.	OBJETIVO GERAL:.....	47
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	47
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
5	ARTIGO	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7	ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento dos mecanismos genético-moleculares implicados na gênese e na progressão do câncer, nas últimas décadas, tem possibilitado o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de tecnologias para o acompanhamento em diversos tipos de neoplasias, o que tem redirecionado de forma drástica a terapêutica do paciente com neoplasia (Hruban et al., 2000; Hidalgo, 2010). O estudo das características moleculares de cada tumor permitirá uma melhor compreensão do seu comportamento e, então, ajudará a delinear estratégias terapêuticas mais efetivas e formas inovadoras de rastreamento, adicionais as opções existentes (Hruban et al., 2009). O presente Estudo objetiva analisar tais características moleculares a fim de melhor compreender o comportamento biológico de uma neoplasia tão agressiva como o carcinoma de pâncreas e, nesse contexto, técnicas de imuno-histoquímica e de biologia molecular desempenham papel fundamental no entendimento do desfecho de tumores de comportamento agressivo e de prognóstico ruim, pois apresentam novas perspectivas de tratamento.

O Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é uma neoplasia que se beneficiará em muito das novas técnicas terapêuticas e diagnósticas com o incremento da biologia molecular, pois, embora não seja uma das neoplasias mais comuns, é a quarta causa de morte relacionada ao câncer nos Estados Unidos (Kumagai et al., 2009) e a taxa de incidência equivale-se à taxa de mortalidade (Ottenhof et al., 2009). Apesar dos avanços na técnica cirúrgica, hoje, considerada a única opção de cura, a taxa de sobrevida média em cinco

anos gira em torno de menos de 5% (1% a 3%) (Weltman et al., 2002; Soto et al., 2006). É considerada a neoplasia com pior prognóstico dentre mais de 60 tipos de câncer, fato evidenciado pela taxa de incidência praticamente igualar-se à taxa de mortalidade (*Warshaw et al 1992, citado por Sakorafas et al 2000).

Pacientes com diagnóstico de Adenocarcinoma de pâncreas deparam-se com uma doença com poucas chances de cura. A sobrevida média em 5 anos é a mais baixa comparada com os outros tipos de cânceres, com uma taxa estimada em torno de 1-3%, como já referido. Esta alta taxa de mortalidade deve-se ao atraso no diagnóstico e à falta de terapias efetivas (Hidalgo, 2010). O câncer de pâncreas é geralmente diagnosticado em um estágio avançado, quando a intervenção cirúrgica não é mais possível. A detecção do tumor em um estágio inicial e, portanto, potencialmente ressecável, pode aumentar a taxa de sobrevida em cinco anos acima de 40% (Yeo et al., 1998; Weltman et al., 2002). Para a identificação de novos alvos terapêuticos e para um tratamento mais efetivo, o processo patológico de progressão do tumor deve ser elucidado com mais detalhes (Sitek et al., 2009).

A habilidade de detectar sucessivas alterações genéticas e epigenéticas dentro de um paradigma de que existe uma lesão pré-cancerígena e, potencialmente detectável, ou ainda melhor, entender o comportamento biológico desses tumores, fornecem um mecanismo útil para a detecção de alterações precoces e definição de marcadores prognósticos (Ranganathan et al., 2009; Vincent et al., 2011). Diante disso, tem-se feito necessária a busca

por esforços para identificar biomarcadores que poderiam potencialmente identificar a neoplasia em estágios precoces e até prever o seu comportamento. Frente a uma neoplasia tão agressiva e silenciosa como o Adenocarcinoma de pâncreas, em que a mortalidade praticamente iguala-se a sua incidência e que a detecção clínica torna-se um desafio. O desafio é que os recentes avanços na compreensão da biologia molecular da carcinogênese, adicionais as práticas vigentes, certamente contribuirão representando, desta forma, uma promissora ferramenta para o aperfeiçoamento de técnicas de rastreio, para abordagem terapêutica e desenvolvimento de drogas alvo-moleculares (Soto et al., 2006).

A identificação de modificações epigenéticas em tecidos tumorais pancreáticos pode ser um fator diferenciado para a aplicação de terapias personalizadas, em que alterações moleculares sugerem alvos específicos ou de algum modo modificam a conduta terapêutica em busca da melhor resposta tumoral (Ottenhof et al., 2009). Cabe salientar que a detecção precoce, em um estágio que ainda exista a opção de cura, associada à maior efetividade terapêutica é, no momento, uma das alternativas para melhorar a perspectiva sombria dos pacientes diagnosticados com câncer de pâncreas (Ardengh et al., 2008).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CÂNCER DE PÂNCREAS

2.1.1. Fatores de risco

O Adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) é responsável por mais de 90% das neoplasias do pâncreas (Osvaldt et al., 2004). As causas do adenocarcinoma do pâncreas permanecem incertas. Os fatores de risco, demográficos e ambientais, relacionados a esta neoplasia incluem o tabagismo, história familiar, pancreatite crônica de repetição, idade avançada, sexo masculino, diabetes *melitus*, obesidade (dietas ricas em carne vermelha e pobre em vegetais e folato), grupo sanguíneo não-O, exposição ocupacional a solventes, níquel, etnia afro-americana, infecção pelo *H. pylori* e mutação no gene da fibrose cística (Ardengh et al., 2008; Vincent et al., 2011). A idade avançada é o fator de risco demográfico mais relevante, que merece ser destacado, pois cerca de 80% dos carcinomas pancreáticos ocorrem entre as idades de 60 e 80 anos. O tabagismo é o mais significativo fator ambiental. Estudos de caso-controle relatam aumento de até 5 vezes na chance de apresentar adenocarcinoma em pacientes fumantes versus não-fumantes, com associação de até 30%; o risco aumenta em fumantes pesados e também em fumantes passivos com exposição ao tabaco de longa data; e ainda são limitados quanto à associação da ingestão de álcool e cafeína (Ardengh et al., 2008; Osvaldt et al., 2004; Hidalgo et al., 2010).

Os estudos ainda são um pouco controversos no que diz respeito à pancreatite crônica. Os valores de associação variam de risco aumentado em 4 vezes maior a 14 vezes maior; um último estudo francês apóia os resultados que defendem uma associação maior, visto que encontraram uma associação de 19 vezes maior nestes pacientes. Há um aumento da incidência proporcional ao tempo de evolução da doença, a cada década há aumento do risco de aproximadamente 2%. A incidência é de 1,8% aos 10 anos após o diagnóstico de pancreatite e 4,0% após 20 anos. (Coelho et al.; 2008; Hidalgo et al., 2010).

O fator de risco considerado mais importante para o desenvolvimento do Adenocarcinoma pancreático é a predisposição genética. Aproximadamente 10% dos pacientes com ADP têm ou terão um parente de primeiro ou segundo grau acometido, e 5-10% dos pacientes com câncer tem história familiar pregressa positiva (Kouzarides et al., 2001). Os fatores genéticos, como o tipo de herança envolvida e os genes responsáveis ainda não estão bem estabelecidos, mas acredita-se que tenha forte associação com mutações no gene BRCA2 e KRAS. Indivíduos com síndromes hereditárias conhecidas, dentre elas a pancreatite hereditária, câncer de mama hereditário (BRCA1, BRCA2), melanoma múltiplo atípico familiar, síndrome da mutação do p16 e a síndrome de Peutz-Jeghers, tem risco aumentado de desenvolver câncer de pâncreas (Ardengh et al., 2008).

Segundo Ardengh et al. (2008), os fatores de risco, uma vez identificados, devem ser categorizados em três escalas conforme o risco de

associação com adenocarcinoma de pâncreas: baixo, moderado e alto risco. A tabela a seguir exibe essa categorização com seus respectivos níveis de associação (Tabela 1):

Tabela 1. Categorias de risco associadas ao Adenocarcinoma de pâncreas.

(Fonte: Ardengh, 2008)

<p>Risco baixo (aumentado de 1–5 vezes)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sexo masculino - Negros - Judeus de ascendência asquenaze - Obesos - Fumantes - Diabéticos - Indivíduos com infecção por <i>Helicobacter pylori</i> - Indivíduos com história de qualquer tipo de câncer em um parente de primeiro grau - Indivíduos com câncer colorretal (não polipose) - Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em um parente de primeiro grau - Indivíduos com mutação genética BRCA1
<p>Risco moderado (aumentado 5-10 vezes)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em dois parentes de primeiro grau - Indivíduos com fibrose cística - Indivíduos com pancreatite crônica - Indivíduos com mutação genética BRCA2
<p>Risco alto (aumentado mais de 10 vezes)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Indivíduos em grupos familiares com melanoma atípico familiar (FAMMM) com mutação p16 e pelo menos um caso de câncer de pâncreas em parente de primeiro grau ou segundo grau - Indivíduos com síndrome de Peutz-Jeghers - Indivíduos com pancreatite hereditária - Indivíduos com história familiar de câncer de pâncreas em três ou mais parentes de primeiro, segundo ou terceiro grau - Possivelmente: indivíduos com mutações BRCA1 e BRCA2, com pelo menos um parente de primeiro e segundo grau com câncer de pâncreas

A maioria dos tumores estão localizados na cabeça do pâncreas (60%). Outras localizações incluem o corpo (13%) e cauda (5%). Mais de 21% dos tumores mostram uma infiltração difusa da glândula. Tipicamente apresentam-se como estruturas glandulares com uma marcada reação estromal (desmoplasia), com invasão vascular e perineural precoces, o que confere a esses tumores um alto potencial metastático e invasão local precoces (Hruban et al., 2001; Ardengh et al., 2008).

2.1.2. Epidemiologia

O câncer de pâncreas representa hoje um grave problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, as estimativas para o ano de 2008 indicavam 37.700 casos novos e 33.300 mortes (Estimated New Cancer and Deaths, 2008). A incidência ajustada para a idade em homens é de aproximadamente 10.1/100.000 e em mulheres 7.5/100.000, nos Estados Unidos; o pico de incidência é na sétima década de vida (**Ahlgren 1996, citado por Sakorafas et al 2000).

Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009) estimam que, no Brasil, o câncer de pâncreas representa 2% de todos os tipos de câncer e é responsável por 4% do total de mortes por câncer. Segundo Moraes et al. (2002), houve um comportamento ascendente das taxas de mortalidade padronizadas por idade para câncer de pâncreas no Brasil (2,56/100.000 em 1980-1982 e 3,2/100.000 em 1995-1997), o que corresponde a um incremento médio anual de 1,31% no período analisado. No Rio Grande do Sul (RS), que corresponde ao Estado com a maior média, Porto Alegre teve a maior taxa,

com 9,4 e 5,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente. A média do estado foi de 7,05/100.000, seguido pela região sudeste, no estado do Rio de Janeiro, com 4,13/100.000 (Moraes et al., 2009).

O quadro clínico silencioso associado com grande agressividade biológica fazem do Adenocarcinoma de pâncreas uma neoplasia de prognóstico reservado. A baixa taxa de sobrevida associada, que gira em torno de 3-5%, é resultado do diagnóstico tardio no curso da doença. Mais de 85% dos pacientes têm doença extra-pancreática no momento do diagnóstico, com extensão aos órgãos vizinhos, tornando a intervenção cirúrgica relativamente ineficaz nestes casos (Sakorafas et al., 2000; Soto et al., 2006; Jemal et al., 2008).

Apesar dos esforços realizados nos últimos anos, o tratamento convencional disponível, como cirurgia, radiação, quimioterapia ou a associação dos mesmos, tem mostrado pouco impacto no curso da doença. Diferentes fatores estão envolvidos nessa apresentação clínica reservada, tais como: falta de estratégias preventivas efetivas, tanto primárias quanto em programas de rastreamento; o diagnóstico geralmente é feito em estágios avançados da doença, principalmente devido à ausência de sintomas específicos em estágios precoces; pouca efetividade da abordagem terapêutica e biologia tumoral agressiva, com invasão local precoce e alto potencial metastático (Weltman et al., 2002; Soto et al., 2006). Segundo Osvaldt et al (2004), apenas 15-20% dos tumores são ressecáveis no momento do

diagnóstico. Mesmo pequenos (menores que 1,0 cm), os carcinomas pancreáticos geralmente são fatais (Takaori et al., 2004).

2.1.3. Modelo de progressão do Adenocarcinoma Ductal Pancreático e Alterações Moleculares

O adenocarcinoma ductal pancreático parece resultar de uma proliferação intraductal não-invasiva através da progressão das alterações histológicas e moleculares. Nas lesões pré-invasivas, designadas Neoplasia Intra-epitelial Pancreática (NIPan), o epitélio normal cuboidal plano, que reveste os ductos, é substituído por células colunares mucinosas, planas ou papilares, com variados graus de displasia, e são classificadas baseadas no grau de anormalidades arquiteturais e citológicas, (Takaori et al., 2004; Hruban et al., 2001; Hruban et al., 2007), como seguem abaixo (Figura 1):

- NIPan 1A: lesões proliferativas planas revestidas por um epitélio colunar alto, com núcleos pequenos, redondos a ovais, basais, e abundante mucina supranuclear; sem atipia citológica ou arquitetural;

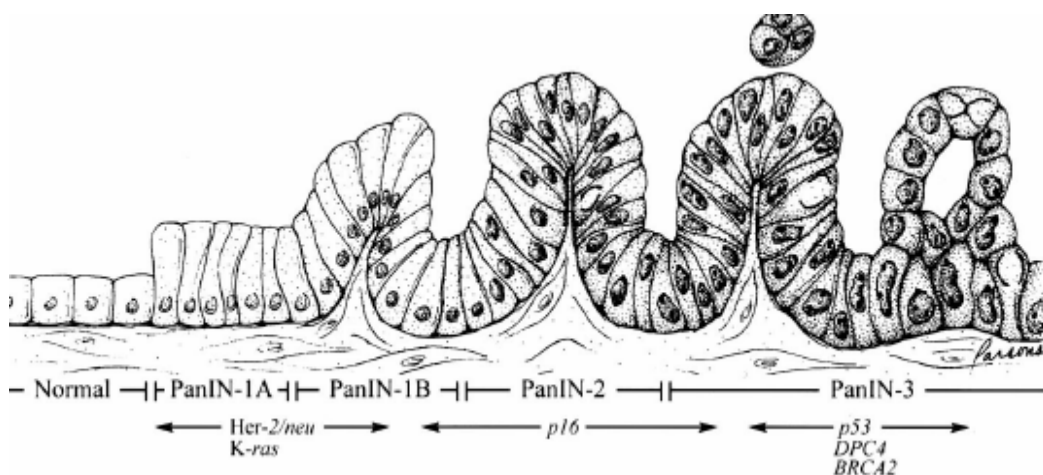
- NIPan 1B: lesões semelhantes às NIPan 1A, porém com uma arquitetura papilar ou micropapilar, com uma leve pseudoestratificação basal; ainda não há evidência de atipias;

- NIPan 2: lesões planas ou papilares, porém com mais atipias citológicas, como pseudoestratificação nuclear, “nuclear crowding”, perda da

polaridade, hipercromasia, aumento nuclear, que conferem displasia de baixo grau; mitoses quando presentes são basais e típicas;

- NIPan 3: lesões com arquitetura papilar mais complexa, padrão micropapilar, com pleomorfismo nuclear acentuado e hipercromasia, nucléolo proeminente; podem apresentar o padrão cribriforme com necrose luminal, células caliciformes distróficas; lembram carcinoma pelo padrão citológico porém não se observa invasão da membrana basal. Evidências de que as NIPan são lesões precursoras, que levam ao desenvolvimento da neoplasia invasora, derivam de pesquisas e observações feitas nos últimos anos (Hruban et al., 2009).

Figura 1: Modelo de progressão do Adenocarcinoma pancreático



(Fonte: Hruban, 2001)

Estudos em autópsias revelaram um aumento na prevalência de NIPan com a idade, correspondendo ao aumento da taxa de câncer pancreático nos grupos de pessoas com idade avançada (Cubilla et al., 2001). Em espécimes de ressecção com adenocarcinoma ductal pancreático, NIPan estão

tipicamente presentes na área ao redor do tumor. NIPan-1 é encontrado em cerca de 75%, NIPan-2 em 65% e NIPan-3 em 50% dos casos (Andea et al., 2003).

As alterações morfológicas que ocorrem nas Neoplasias Intra-epiteliais Pancreáticas (NIPan) ocorrem paralelas às alterações genéticas (Soto et al., 2006; Hruban et al., 2009). A maioria das alterações genéticas observadas nas neoplasias invasoras também são observadas nas lesões precursoras, tornando-as assim eventos precoces que levam ao desenvolvimento do tumor. Mutações em oncogenes e em genes supressores tumorais há muito tempo são caracterizadas como um dos eventos mais importantes da carcinogênese (Ranganathan et al., 2009; Hruban et al., 2009; Hidalgo et al., 2010).

Como previsto pelo modelo de progressão, algumas lesões precoces, de baixo grau, como NIPan-1 e NIPan-2, exibem alterações genéticas como encurtamento dos telômeros, ativação na mutação no códon 12 do oncogene KRAS2, inativação do gene supressor tumoral CDKN2A/p16 (Almoguera et al., 1998; Hruban et al., 2000; Van Heek et al., 2002). Mutações no gene KRAS2 tem sido reportadas em 36% a 44% das lesões precursoras de baixo grau, enquanto cerca de 87% das lesões de alto grau são conhecidas por portar este tipo de mutação (Lohr et al., 2005).

Lesões precursoras em estágios mais avançados, de alto grau (NIPan 3) abrigam uma variedade de alterações moleculares adicionais incluindo

inativação de genes supressores tumorais como SMAD4 e TP53 (Maitra et al., 2003).

A mutação no gene KRAS, que atua como mediador do crescimento, proliferação celular e apoptose, é encontrada em cerca de 10-30% nas NIPan-1, 45% nas NIPan-2 e 85% nas NIPan-3 e os tumores que apresentam tal alteração costumam ser mais agressivos e responder menos as terapias padrão (Li et al., 2003; Lohr et al., 2005). Nos casos em que ocorre mutação no gene KRAS, o mesmo adquire propriedades oncogênicas, passando a atuar no estímulo ao crescimento e à proliferação celular da célula cancerígena, com isso mutações no gene KRAS são observadas em até 90% dos adenocarcinomas ductais pancreáticos avançados e como uma das primeiras mutações das lesões precursoras (Li et al., 2003; Li et al. 2004). Dessa forma, terapias-alvo têm sido desenvolvidas na tentativa de reduzir a atividade do KRAS, mas o mesmo tem se mostrado refratário à maioria das estratégias até agora testadas. (Kubrusly et al., 2002).

Um dos eventos mais precoces que levam à instabilidade genômica na carcinogênese do câncer de pâncreas envolve alteração dos telômeros iniciada por um processo de erosão dos mesmos. Os telômeros estão presentes nas extremidades dos cromossomos e protegem contra a fusão de sequências de DNA de cromossomos diferentes. Um encurtamento extremo dos telômeros leva a formação de pontes na anáfase durante o processo de mitose e conseqüentemente leva à instabilidade numérica e estrutural do genoma. Tal alteração se expressa 90% das lesões intra-epiteliais pancreáticas de baixo

grau (Van Heek et al., 2002; Lohr et al., 2005). Na verdade, o que acontece especificamente no adenocarcinoma de pâncreas é que o encurtamento dos telômeros observado nas neoplasias intra-epiteliais acaba levando a um aumento da expressão da telomerase por um mecanismo compensatório intracelular, que leva a um enlogamento dos telômeros já na fase mais invasiva do câncer de pâncreas, levando a imortalidade celular (Nakashima et al., 2009). A enzima responsável pelo processo, a telomerase, quase não é detectada em células somáticas normais, tornando-a um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos métodos de rastreio (Hahn et al., 1999; Nakashima et al., 2009). Considerando a participação da telomerase na carcinogênese do câncer de pâncreas, o uso de inibidores dessa enzima poderia ter uma resposta significativa em neoplasias malignas do pâncreas.

O TP53, um gene supressor de tumor, é o gene supressor tumoral mais frequentemente inativado em neoplasias sólidas, e é inativado em 55% a 75% das neoplasias pancreáticas invasivas. Mutação no gene TP53 é um evento relativamente tardio na tumorigênese do câncer de pâncreas (Ottenhof et al., 2009).

Mutações no gene BRCA2, outro gene supressor tumoral, também encontra-se presente na tumorigênese do câncer de pâncreas, porém é descrito como um evento mais tardio na sequência da transformação neoplásica. Portadores de mutações nesse gene apresentam um risco elevado de desenvolvimento não só do câncer de pâncreas como também tumores de

mama, ovário e próstata. Alterações genéticas em outros genes com menor prevalência também têm sido descritas (Takaori et al., 2004; Soto et al., 2006).

A identificação e caracterização destas alterações genéticas presentes nos tumores pancreáticos invasivos e em seus precursores formam uma base para a detecção das mesmas no sangue, urina, fezes, suco pancreático, saliva, etc, e, assim, tornam-se uma ferramenta importante no diagnóstico precoce e conseqüente aumento da sobrevida dos pacientes (Nakashima et al., 2009). A taxa de sobrevivência é “estádio-depedente”, portanto, quanto mais cedo for feito o diagnóstico, melhor será a sobrevida destes pacientes e as estatísticas tão alarmantes do câncer de pâncreas podem mudar significativamente (Osvaldt et al., 2004; Ardengh et al., 2008).

2.2. MECANISMOS EPIGENÉTICOS

A caracterização das alterações genéticas e epigenéticas nos tumores de pâncreas tem permitido uma melhor compreensão do modelo de progressão da doença em nível molecular. A história natural dos tumores pancreáticos mostra um comportamento biológico agressivo e uma taxa acelerada de progressão, conferindo um alto potencial metastático a esses tumores. As células pancreáticas são intrinsicamente químió-resistentes e, como consequência do acúmulo de diferentes alterações genéticas e epigenéticas ao longo do processo de tumorigênese, as células tornam-se ainda mais resistentes a quimioterapia e radioterapia (Soto et al., 2006; Hruban et al., 2009). Nesse contexto, tem havido recentemente importantes avanços na compreensão da biologia molecular, bem como no diagnóstico, estadiamento e tratamento de

pacientes com tumores em estágio inicial. Contudo, mínimos progressos tem sido feitos no que diz respeito a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento em pacientes com estágio avançado da doença (Ranganathan et al., 2009; Hidalgo et al., 2010).

Embora atualmente estejam disponíveis técnicas para identificação do Adenocarcinoma de pâncreas em fase inicial na população em geral, elas são inviáveis, impraticáveis ou ineficazes, face aos seus elevados custos, à baixa incidência desta doença e à difícil localização do órgão (retroperitoneal). Porém, sua utilização poderia ser considerada ao se definir com mais precisão os grupos de risco que mereceriam vigilância (Osvaldt et al., 2004; Ardengh et al., 2008).

Alterações cumulativas sofridas pelas células epiteliais pancreáticas induzem a uma progressiva anormalidade funcional em pontos chaves como: crescimento celular (ciclo celular, apoptose, fatores de crescimento, receptores e outros elementos dos sinais da transdução); estabilidade genômica (sistema de reparo ao DNA); matriz extracelular e interação com estroma tumoral e angiogênese. Eventos que induzem a carcinogênese e progressão tumoral envolvem mutações em oncogenes, resultando em dominante ganho de função, e mutação ou deleção em genes supressores tumorais com resultante perda de sua ação inibitória (Soto et al., 2006; Sitek et al., 2009).

Sabe-se, portanto, que o desenvolvimento do carcinoma envolve um acúmulo de alterações genéticas sequenciais. A evidência mais forte desta

sequência vem da análise das lesões precursoras. O modelo de estudo referência das lesões neoplásicas evolutivas é o de Vogelstein et al (1988) no carcinoma colorretal, que propõe uma sequência de alterações genéticas cumulativas nas células epiteliais colônicas normais: mutação do gene APC, formação de pólipos adenomatosos com transformação para displasia em graus variados e, finalmente, o adenocarcinoma colorretal. No contexto clínico-morfológico do adenocarcinoma ductal pancreático, as observações de Hulst et al (1905) dão início a um modelo de lesões pancreáticas precursoras intraductais (Takaori et al., 2004). Posteriormente, características morfométricas dos núcleos destas lesões foram encontradas e correlacionadas com o grau de invasividade destas lesões. No entanto, apesar de já se ter conhecimento das lesões pancreáticas pré-neoplásicas desde o século passado, foi no ano de 2001 que Hruban et al (2001) publicaram a definição original das neoplasias intra-pancreáticas.

Nos processos de carcinogênese existe uma grande influência dos mecanismos epigenéticos, os quais são importantes por alterarem a expressão de genes chaves no processo de oncogênese; envolvem mecanismos de ativação ou silenciamento de genes, através de modificações na conformação da cromatina ou do DNA, porém sem alterar a sequência de nucleotídeos (Delpu et al., 2011).

Atualmente se questiona quais eventos seriam os primeiros a ocorrer no processo de tumorigênese, já que várias etapas são necessárias até a formação de uma célula maligna, e alterações epigenéticas são presenciadas

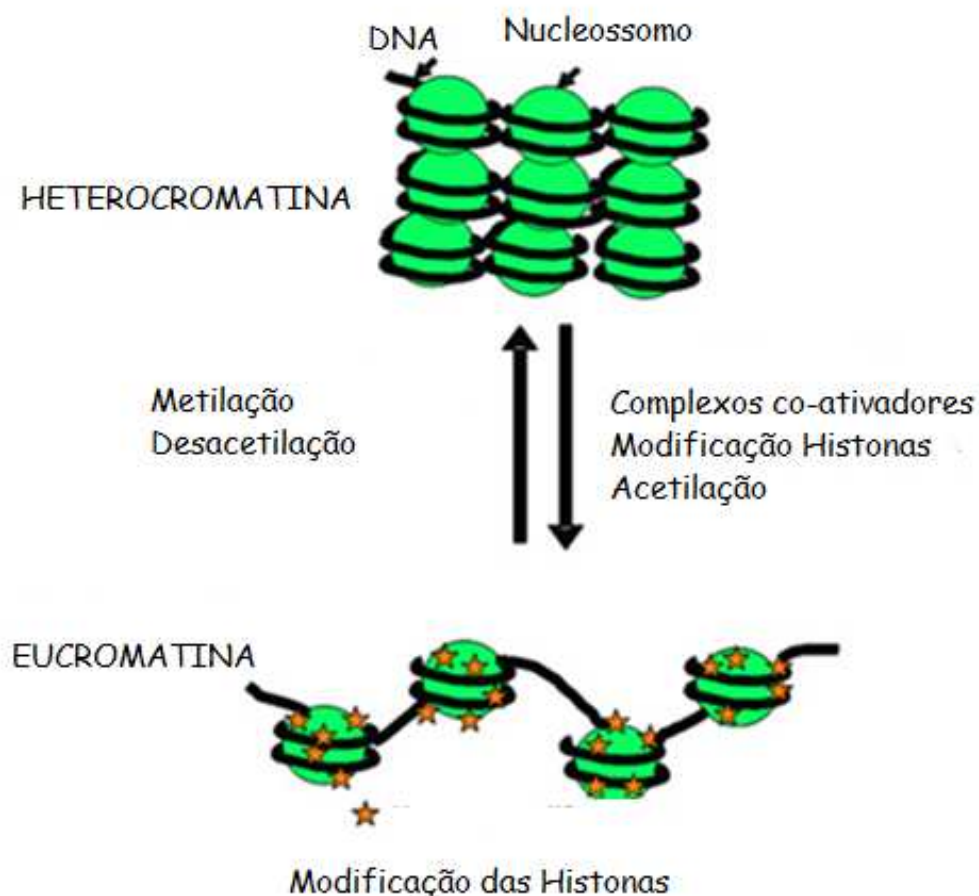
em praticamente todos os tipos de tumores. Há possibilidade de que o mecanismo deflagrador do desenvolvimento de uma neoplasia seja uma modificação epigenética, que causaria uma instabilidade do genoma permitindo assim o acúmulo de outras alterações necessárias na formação de um tumor (Kumagai et al., 2009; Delput et al., 2011).

Feinberg et al (2001) define a epigenética como modificações no genoma transmitidas durante a divisão celular, mas que não alteram as sequências de bases nucleotídicas da molécula de DNA. Os padrões epigenéticos são sensíveis a modificações ambientais que podem causar mudanças fenotípicas que serão transmitidas a seus descendentes.

Existem dois mecanismos principais envolvidos na epigenética: modificação no padrão de acetilação das histonas e padrão de metilação do DNA. Esses mecanismos atuam modificando a conformação da cromatina, o que interfere na regulação da transcrição localmente ou globalmente, pelas modificações no DNA e pelas modificações ou rearranjos dos nucleossomos (Lund et al., 2004). Além desses principais mediadores epigenéticos, há também a presença de RNAs não codificadores, que podem atuar interferindo na transcrição de genes. Eventos epigenéticos incluindo a metilação do DNA e as modificações das histonas apresentam um importante papel para o desenvolvimento normal e são cruciais para estabelecer a programação correta da expressão dos genes (Rodenhiser et al., 2006).

Os nucleossomos e as histonas são estruturas associadas ao DNA com a função de organização da cromatina. Tal organização está intimamente associada à expressão gênica. Mudanças na estrutura da cromatina influenciam a expressão de genes, sendo que, estes estão inativos quando a cromatina está condensada e os genes são expressos quando a cromatina estiver aberta, ou seja, não condensada. Esses estados dinâmicos da cromatina são controlados por padrões epigenéticos reversíveis de metilação do DNA e de modificações das histonas (acetilação) (Lund et al., 2004; Rodenhiser et al., 2006).

Figura 2: Modificações das histonas associadas à transcrição da heterocromatina para eucromatina



Fonte: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: jlhuret@atlasgeneticsoncology.org

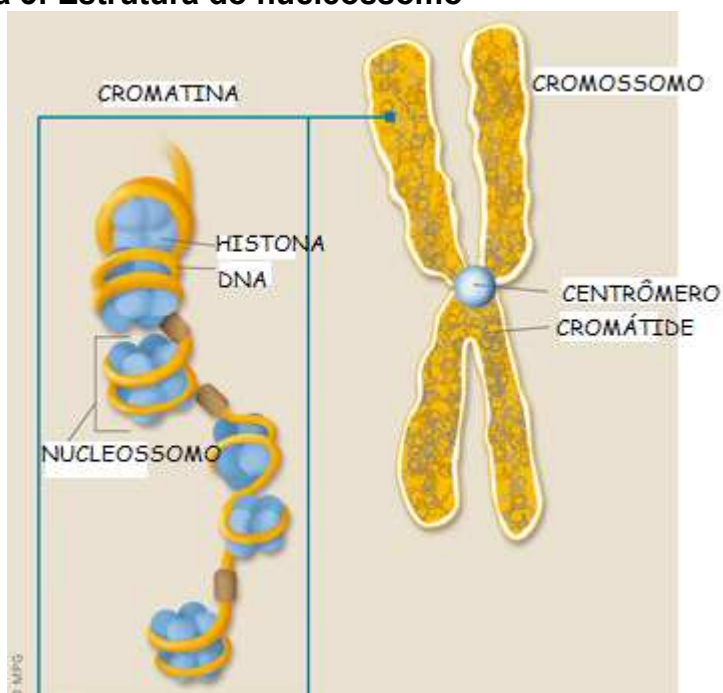
Existe uma forte correlação entre a cromatina inativa com a metilação do DNA, ou seja, a metilação silencia a expressão dos genes. Quando o DNA estiver hipometilado, a cromatina estará ativa, permitindo a transcrição dos genes. Porém, quando o DNA estiver hipermetilado, a cromatina estará inativa, impedindo a expressão dos genes (D'Alessio et al., 2006).

Metilação do DNA, especialmente metilação associada ao silenciamento de genes supressores tumorais, é uma das alterações epigenéticas mais amplamente estudadas, juntamente com outra importante rota epigenética da carcinogênese que envolve o padrão aberrante de modificação das histonas, que serviu de embasamento para o trabalho em desenvolvimento.

2.2.1. Modificações nas histonas

A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, que consiste em aproximadamente 146 pares de bases de DNA enroladas ao redor de um octâmero central de proteínas conhecidas como histonas (Fischle et al., 2003).

Figura 3: Estrutura do nucleossomo



Fonte: Lookfordiagnosis.com

As histonas são proteínas básicas pequenas que consistem de um domínio globular C-terminal, em que o filamento de DNA se enrola, e de uma cauda N-terminal flexível, não-estruturada, que sobressai do conjunto (Luger et al., 1997). A cauda N-terminal das histonas pode sofrer uma variedade de modificações pós-traducionais de resíduos específicos, incluindo metilação, acetilação, ubiquitinação, ribolisação, citrulinação e fosforilação entre outros. Tais modificações regulam diversos processos celulares, como transcrição, replicação e reparo do DNA (Kouzarides et al., 2007).

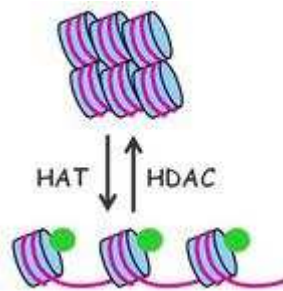
Esse domínio globular é alvo de modificações pós-translacionais uma vez que estão localizados na superfície da cromatina e portanto acessíveis ao maquinário enzimático. O octâmero central do nucleossomo é formado por quatro tipos de histonas: um tetrâmero H3-H4 e dois dímeros H2A-H2B.

Acredita-se que a acetilação das histonas H3 e H4 nas caudas N-terminais seja um sinal predominante para a ativação da cromatina, aumentando a acessibilidade da maquinaria de transcrição (Kuo et al., 1998). Nucleossomos adjacentes são ligados via DNA (DNA ligante), cujo comprimento varia de 10-60 pares de bases nitrogenadas, de acordo com a espécie e o tipo celular. A trajetória de entrada e saída deste DNA ligante no nucleossomo é determinada por um quinto tipo de histona, que é a Histona H1/H5 ou histona ligante. Além disso, a histona H1 juntamente com outras proteínas não-histonas estão envolvidas na estruturação da cromatina (Sivolob et al., 2003).

Inicialmente, as proteínas histonas foram consideradas componentes meramente estruturais, as quais reuniam uma grande quantidade de DNA genômico em uma estrutura que pode ser facilmente acomodada pelo núcleo das células. Entretanto, atualmente, são reconhecidas pelo seu envolvimento na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina (Fischle et al., 2003).

A acetilação, alteração mais extensivamente estudada, considerada um mecanismo de estímulo à transcrição, é controlada por duas famílias de enzimas: as histonas-acetiltransferases (HATs acetiladoras) e as histonas-desacetilases (HDACs desacetiladoras). As acetiltransferases são catalisadoras da adição de um grupo acetil as histonas, funcionando como co-ativadoras da transcrição, e as desacetilases removem os grupos acetil, causando repressão da transcrição (Villar-Garea et al., 2004; Peterson et al., 2005).

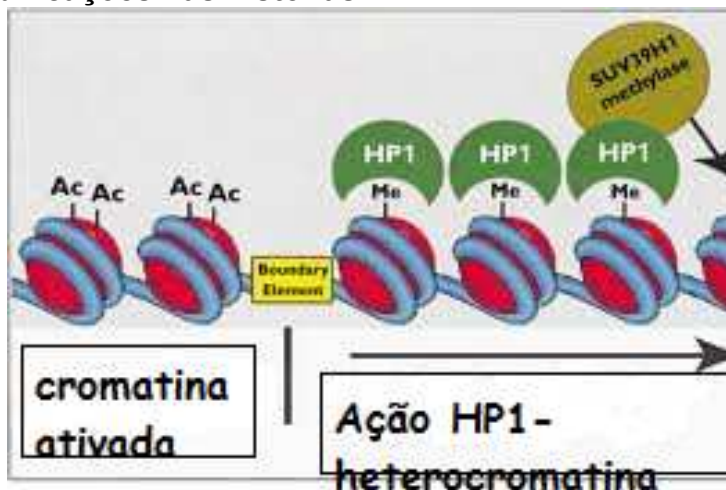
Figura 4: Ação das histonas acetilases (HAT) e histonas-desacetilases (HDAC)



Fonte: Virtual.epm.br

A estrutura da cromatina desempenha importante papel na regulação da expressão dos genes. Cromatina contendo lisinas hipoacetiladas nas histonas possui uma estrutura compacta que é repressiva para a transcrição (silenciamento de genes transcricionais). A presença de certas lisinas acetiladas na cauda das histonas está associada com cromatina menos condensada e genes transcricionalmente ativos. Estudos indicam que a cromatina ativa é a hiperacetilada, enquanto se torna inativa quando é desacetilada. Nesse contexto de silenciamento por desacetilação estão os genes supressores de tumor que, com a perda de função decorrente das modificações epigenéticas, contribuem para o desenvolvimento tumoral (Kuo et al., 1998; Menditi et al., 2007).

Figura 5: Alteração no posicionamento do nucleossomo de acordo com as modificações nas histonas



Fonte: www.ufpe.br/biolmol

A descoberta dessas modificações ocorreu na década de 60 quando Alfrey et al notou a correlação entre a acetilação das histonas aumentada e o aumento da transcrição (Feinberg, 2001). Essas modificações afetam a função dos cromossomos através de dois mecanismos distintos:

- primeiro, aproximadamente todas as modificações alteram a carga eletrostática das histonas e isso, a princípio, pode mudar as suas propriedades estruturais e ligantes do DNA;

- secundariamente, tais modificações podem criar, estabilizar, romper ou ocluir domínios de interação na cromatina para proteínas regulatórias, como fatores da transcrição, proteínas envolvidas na condensação da cromatina e reparo ao DNA. Assim, constituem a principal categoria de controle transcricional epigenético (Feinberg, 2001; Rosa et al., 2005).

Níveis estacionários de acetilação no núcleo das histonas resultam do balanço das atividades antagonistas das histonas acetiltransferases e histonas desacetilases (Wade et al., 2001). O desequilíbrio no processo de acetilação e desacetilação das histonas em regiões promotoras, apresentado por várias classes de tumores, contribui para a desregulação da expressão gênica e tem sido associado à carcinogênese e à progressão do câncer, tornando-se alvo de intensa investigação (Lehrmann et al., 2002; Villar-Garea et al., 2004). A acetilação das histonas é regulada de modo reversível por um balanço entre as atividades das HATs e HDACs. Como já referido, níveis elevados de histonas acetiladas estão relacionados com a existência de atividade transcricional (cromatina menos condensada), enquanto níveis diminuídos do grau de acetilação estão relacionados com a repressão da transcrição (cromatina condensada) (Wade et al., 2002; Elsheikh et al., 2009). A questão envolvida neste caso é o que talvez difere o comportamento de um tumor para o outro, ou seja, quais genes estão sendo ativados ou inativados pela alteração da transcrição, genes supressores tumorais ou oncogenes, talvez a biologia molecular intrínseca de cada tumor seja essencial neste processo. A consequência da atividade alterada das enzimas modificadoras das histonas tem sido extensamente associada à expressão inapropriada de alguns genes que poderiam ter função na biologia do tumor. O desequilíbrio entre acetilação e desacetilação levando a expressão de oncogenes ou silenciamento de genes supressores de tumor ainda não é bem compreendida na rota de câncer pancreático (Seligson et al., 2005).

As histonas-desacetilases (HDAC) têm sido divididas em quatro classes diferentes, e estão sendo minuciosamente estudadas devido a dois motivos principais: primeiro, por interferirem na rota de um mecanismo relacionado à tumorigênese, relacionadas com a patogênese de diversos tipos de cânceres; segundo, pequenas moléculas inibidoras das HDAC (iHDAC) possuem a capacidade de interferir na atividade destas enzimas e conseguir efeitos biológicos significativos em modelos pré-clínicos de câncer, tornando-se possíveis alvos-terapêuticos da biologia molecular (Wang et al., 2001; Tzao et al., 2009). Exemplo prático são os inibidores das histona-desacetilases, que permitem a acetilação das histonas e convertem a cromatina em uma estrutura aberta, ativando vários genes supressores que inibem o crescimento tumoral (Ouaisi et al., 2008).

Diferenças nos níveis celulares de modificação das histonas possuem desfechos clínicos avaliados em certos tipos de câncer. Mudanças em locus específico na acetilação das histonas tem sido relacionadas a diversas expressões alteradas de muitos genes críticos na tumorigênese do câncer de pâncreas, enquanto que alterações mais amplas na expressão de certos genes, observadas após o tratamento com inibidores das histonas-desacetilase, sugerem que as modificações nas histonas possuem um papel mais amplo na regulação da expressão de genes no câncer de pâncreas, do que até então se pensava (Kumagai et al., 2009; Manuyakorn et al., 2010).

Padrões celulares de modificação das histonas fornecem informações prognósticas adicionais independentes para diversos tipos de tumores,

incluindo próstata, rim, pulmão, estômago, ovário e câncer de mama (Seligson et al., 2009; Elsheikh et al., 2009).

Elsheikh et al (2009) investigou o padrão de acetilação das histonas em câncer de mama, em uma coorte de 880 casos, através da marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-histonas H3K18ac, H3K9ac e HAK12ac; Os resultados mostraram uma significativa correlação entre os níveis individuais de cada marcador com uma gama de variáveis clínico-patológicas; em particular, tumores de alto grau foram associados com baixos níveis de expressão da acetilação das histonas; níveis relativamente altos de acetilação foram associados com prognóstico favorável e detectados em aproximadamente 93% dos tumores de mama bem diferenciados, de baixo grau; níveis moderados a baixos de acetilação foram observados em carcinomas com prognóstico reservado, incluindo carcinoma basais e tumores HER-2 positivos. Os marcadores selecionados para o estudo foram previamente estudados e escolhidos por terem uma relevância significativa em tumores.

Manuyakorn et al (2010), estudando tumores de câncer de pâncreas de pacientes em estágios iniciais, descobriu que níveis celulares baixos de acetilação da histona H3K18 (<35% de células) foram preditores independentes de sobrevida e piora na resposta ao tratamento com 5-fluorouracil, em pacientes em estágio I e II. No entanto, nenhum estudo foi desenhado para avaliar as modificações das histonas que tendem a mostrar

um padrão diferente de expressão, como acetilação da H4K12, ou alterações das histonas em pacientes com doença pancreática avançada (estágio III-IV).

Se for possível desvendar o mecanismo pelo qual as modificações das histonas estão associadas com o desenvolvimento do câncer e sua progressão, novas estratégias poderão ser desenvolvidas no intuito de interferir na rota carcinogênica. Em conjunto com eventos genéticos, as alterações epigenéticas associadas aos tumores mostram-se importantes determinantes na iniciação e progressão do câncer de pâncreas e representam promissores biomarcadores.

2.2.2. Perspectivas futuras: Inibidores das Histonas-desacetilases (iHDAC)

Muitos agentes anti-câncer têm sido usados no tratamento do Adenocarcinoma pancreático, tanto como quimioterapia única quanto combinada. Embora o Gencitabine, a droga mais usada, tenha sido aceita como terapia padrão-ouro no tratamento do adenocarcinoma pancreático local ou metastático, baseado nos benefícios clínicos já obtidos, não existe ainda uma terapia efetiva que aumente a sobrevida nesta doença (Morales et al., 2005).

A descoberta de que alterações significativas na metilação do DNA e modificação da acetilação das histonas são comumente achados em diversas neoplasias inspirou a busca por alvos terapêuticos que interferissem nesse processo e que levassem ao desenvolvimento de drogas que atuassem no mecanismo epigenético da carcinogênese. Recentemente, tem sido mostrado

que a regulação da estrutura da cromatina através de modificações nas histonas por acetilação/desacetilação representam um importante controle da transcrição gênica. A hiperacetilação das histonas por agentes específicos inibidores das histonas-desacetilases pode de fato afetar processos de apoptose, proliferação celular e diferenciação (Morales et al., 2005; Minucci et al., 2006).

Um dos grupos mais promissores de agentes nessa área é o dos inibidores das histonas-desacetilases, que possuem diferentes propriedades bioquímicas e biológicas, porém possuem uma única atividade em comum: induzir a acetilação das histonas, proteínas-chave na estrutura dos nucleossomos e cromatina. Um dos seus principais mecanismos de ação é a reativação da transcrição de genes supressores tumorais silenciados, como p21 (Zhu et al., 2003; Minucci et al., 2006).

O uso de iHDAC , principalmente, em associação com quimioterápicos clássicos ou em combinação com agentes de desmetilação do DNA, são drogas promissoras para pacientes com câncer. Acredita-se que os efeitos anticarcinogênicos dos inibidores das histonas-desacetilases são mediados pela reativação da expressão de genes supressores tumorais nas células malignas. No entanto, outros fatores também podem ter um papel importante. Tratamento de linhagens tumorais com os inibidores das histonas-desacetilases tem efeitos pleiotrópicos, como indução da diferenciação, diminuição da proliferação celular por parada do ciclo celular na fase G1 e/ou G2 e indução da apoptose (Villar-Garea et al., 2004; Haefner et al., 2008), como já referido.

García-Morales et al (2005) testaram a atividade antitumoral dos inibidores da desacetilase de histonas em três linhagens celulares bem caracterizadas de adenocarcinoma de pâncreas. Os resultados apresentados mostraram que os inibidores das histonas-desacetilases são capazes de induzir apoptose maciça nas três linhagens de células testadas, independentemente da sua resistência intrínseca a outras drogas anti-tumorais. Os inibidores testados, TSA (Trichostatin A) e SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid), reduziram dramaticamente a viabilidade das células tumorais e promoveram apoptose em diferentes linhagens químio-resistentes. O estudo sugere que os inibidores das histonas-desacetilases podem ter um grande potencial terapêutico contra o adenocarcinoma de pâncreas, ainda mais considerando a resistência intrínseca normal desta neoplasia.

As estruturas dos compostos que inibem as desacetilases de histonas incluem ácidos graxos de cadeia curta, derivados do ácido butírico e ácido valproico; ácidos hidroxâmicos (SAHA, piroxamida, TSA); tetrapeptídeos cíclicos (trapoxin, apicidin e depsipeptídeo); benzamidas (MS-275) (Campos et al., 1999; Ramos et al., 2002).

Além disso, o uso de inibidores das histonas-desacetilases sensibiliza as células cancerígenas ao tratamento quimioterápico, e a possibilidade do seu uso em terapia combinada parece ser o mais efetivo. Contudo, o mecanismo mais amplamente estudado é o sinergismo entre agentes desmetiladores com inibidores das histonas-desacetilase (Villar-Garea et al., 2004; Tzao et al.,

2009). Tal combinação possui duas vantagens: primeiro, a dose necessária de cada droga para inibir a proliferação celular ou induzir apoptose é usualmente bem menor se usadas separadamente, reduzindo efeitos colaterais e toxicidade; segundo, a resistência a certos quimioterápicos diminui em certos casos com o uso de drogas combinadas (Zhu et al., 2003; Tzao et al., 2009). Entende-se, portanto, que a caracterização das alterações epigenéticas presentes no câncer de pâncreas tem contribuído para melhor compreender acerca da progressão da doença a nível molecular e tem permitido, assim, o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de novas drogas promissoras, o que redireciona a terapêutica frente ao diagnóstico.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral do presente estudo consiste em avaliar a expressão das histonas por técnica imunohistoquímica no Adenocarcinoma ductal pancreático.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar o padrão de acetilação de histonas em amostras de tecido tumoral por avaliação de marcação imunohistoquímica com os anticorpos contra H3K18ac, H3K9ac e H4K12ac;
- Correlacionar o padrão de acetilação de histonas no Adenocarcinoma de pâncreas com dados clinico-anatomopatológicos e de resposta ao tratamento nos pacientes avaliados;
- Avaliar o papel prognóstico da acetilação de histonas por meio de correlações com os dados de sobrevida global e livre de doença dos pacientes incluídos no estudo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. **Cell**. 1988; 53: 549-554.

Andea A, Sakar F, Adsay NV. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. **Mod Pathol**. 2003; 16(10): 996-1006.

Ardengh JC, Coelho N, Osvaldt AB. Câncer do pâncreas em fase inicial: é possível identificá-lo através dos instrumentos científicos e propedêuticos atualmente disponíveis? **Arq Gastroenterol**. 2008; 45(2): 169-77.

Ashktorab H, Belgrave K, Hosseinkhah F, et al. Global histone H4 acetylation and HDAC2 Expression in colon adenoma and adenocarcinoma. **Dig Dis Sci**. 2009; 54(10): 2109-2117.

Canto MI, Goggins M, Yeo CJ, et al. Screening for pancreatic neoplasia in high-risk individuals: an EUS-based approach. **Clin Gastroenterol Hepatol**. 2004; 2(7): 606-21.

Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. **Cancer Res**. 1976; 36: 2690-2698.

D'Alessio AC, Szyf M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relations between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochem Cell Biol**. 2006; 84: 463-76.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors and patient outcome. **Cancer Res**. 2009; 69(9): 3802-09.

Estimated New Cancer Cases and Deaths. **Cancer Facts and Figures**. 2008. American Cancer Society.

Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001; 98(2): 392-94.

Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. **Curr Opin Cell Biol**. 2003; 15: 172-83.

Furasté PA. Normas técnicas para o trabalho científico: Elaboração e Formatação. Explicitação das Normas da ABNT. 15. ed., Porto Alegre: s.n., 2009.

García-Morales P, Gómez-Martínez A, Carrato A, et al. Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. **Mol Cancer Ther**. 2005; 4(8): 1222-30.

- Haefner M, Bluethner T, Niederhagen M, et al. Experimental treatment of pancreatic cancer with two novel histone deacetylase inhibitors. **World J Gastroenterol**. 2008; 14(23): 3681-92.
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. **Nat Med**. 1999; 5(10): 1164-1170.
- Hidalgo M. Pancreatic cancer. **New Engl J Med**. 2010; 362(17): 1605-17.
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. **Am J Surg Pathol**. 2001; 25(5): 579-86.
- Hruban RH, Adsay NV. Molecular classification of neoplasms of the pancreas. **Hum Pathol**. 2009; 40(5): 612-23.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. **Clin Cancer Res**. 2000; 6(8): 2969-72.
- Hruban RH, Klimstra DS, Pitman MB. Tumors of the pancreas. **Atlas of tumor pathology**, fascicle 6, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 2007. Vol 4th series.
- Jemal A, Siegel IR, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J Clin**. 2008; 58(2): 71-96.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. **Cell**. 2007; 128(4): 693-705.
- Kumagai T, Akagi T, Desmod JC, et al. Epigenetic regulation and molecular characterization of C/EBPalpha in pancreatic cancer cells. **Inst J Cancer**. 2009; 124(4): 827-833.
- Kuo MH, Allis CD. Role of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. **Bioessays**. 1998; 20(8): 615-26.
- Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. **Adv Cancer Res**. 2002; 86: 41-65.
- Li D, Jiao L. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. **Int J Gastrointest Cancer**. 2003; 33(1): 3-14.
- Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. **Neoplasia**. 2005; 7(1): 17-23.

- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**. 1997; 389(6648): 251-60.
- Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. **Genes Dev**. 2004; 18(19): 2315-35.
- Maitra A, Adsay NV, Argani P, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. **Mod Pathol**. 2003; 16(9): 902-12.
- Manuyakorn A, Paulus R, Farrell J, et al. Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704. **J Clin Oncol**. 2010; 28(8): 1358-65.
- Menditi KBC, Kang HC. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2007; 53(4): 453-460.
- Milutinovic S, Zhuang Q, Szyf M. Proliferating cell nuclear antigen associates with histone deacetylase activity, integrating DNA replication and chromatin modification. **J Biol Chem**. 2002; 277(23): 20974-78.
- Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nat Rev Cancer**. 2006; 6(1): 38-51.
- Moraes VM. Evolução do padrão alimentar e tendência da mortalidade por câncer de pâncreas nas capitais do Brasil, 1980-1997. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro; 2002. s.n. Escola Nacional de Saúde Pública.
- Muller HR, Prado KB. Epigenética: um novo campo da genética. **Revista Unicenp de Biologia & Saúde**. 2008; 1(3): 61-69.
- Nakashima A, Murakami Y, Uemura K, et al. Usefulness of human telomerase reverse transcriptase in pancreatic juice as a biomarker of pancreatic malignancy. **Pancreas**. 2009; 38(5): 527-33.
- Núcleo de Informações em Saúde - NIS/DAS/SES-RS, 2008.
- Osvaldt AB, Vanin GF, Backes NA, et al. Ressecções pancreáticas: Experiência do Grupo de Fígado, Vias Biliares e Pâncreas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 2000 e 2003. **Revista do HCPA & Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 2004; 24: 13-27.
- Ottenhof NA, Milne AN, Morsink FH, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: of mice and men. **Arch Pathol Lab Med**. 2009; 133(3): 375-81.

Ouaïssi M, Sielezneff I, Silvestre R, et al. High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. **Ann Surg Oncol.** 2008; 15(8): 2318-28.

Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. **Curr Biol.** 2004; 14(14): 546-51.

Ranganathan P, Harsha HC, Pandey A. Molecular alterations in exocrine neoplasms of the pancreas. **Arch Pathol Lab Med.** 2009; 133(3): 405-412.

Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ.** 2006; 174(3): 341-48.

Sakorafas GH, Tsiotou AG, Tsiotos GG. Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. **Cancer Treat Rev.** 2000; 26(1): 29-52.

Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **Eur J Cancer.** 2005; 41(16): 2381-402.

Seligson DB, Horvath S, Shi T, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. **Nature.** 2005; 435(7046): 1262-66.

Sitek B, Sipos B, Alkatout I, et al. Analysis of the pancreatic tumor progression by a quantitative proteomic approach and immunohistochemical validation. **J Proteome Res.** 2009; 8(4): 1647-1656.

Sivolob A, Prunell A. Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs. **J Mol Biol.** 2003; 331(5): 1025-40.

Soto JL, Barbera VM, Saceda M, Carrato A. Molecular biology of exocrine pancreatic cancer. **Clin Transl Oncol.** 2006; 8(5): 306-12.

Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. **Pancreas.** 2004; 28(3): 257-62.

Tzao C, Tung HJ, Jin JS, et al. Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. **Mod Pathol.** 2009; 22(2): 252-260.

van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. **Am J Pathol.** 2002; 161(5): 1541-7.

Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. **Int J Cancer.** 2004; 112(2):171-8.

Vincent A, Herman J, Schulik R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic Cancer. **Lancet.** 2011; 378(9791): 607-20.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med**. 1988 319(9): 525-32.

Wade PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. **Hum Mol Genet**. 2001; 10(7): 693-98.

Wang C, Fu M, Mani S, Wadler S, Senderowicz AM, Pestell RG. Histone acetylation and the cell-cycle in cancer. *Front Biosci*. 2001; 6: 610-629.

Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2002; 46(4): 351-360.

Weltman E, Salvajoli JV, Hanriot RM, et al. Radioterapia em adenocarcinoma de pâncreas. **Rev Assoc Med Bras**. 2002; 48(2): 118-28.

Yeo CJ, Cameron JL. Prognostic factors in ductal pancreatic cancer. **Langenbecks Arch Surg**. 1998; 383(2): 129-33.

Zhu WG, Otterson GA. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. **Curr Med Chem Anticancer Agents**. 2003; 3(3): 187-99.

H4K12 and H3K18 Acetylation Associates with Poor Prognosis in Pancreatic Cancer

Camila Nóbrega Juliano^{1,2}, Patricia Izetti^{3,4}, Marcia Pithan Pereira^{1,2}, Alex Pritzel dos Santos⁵, Charles Pedro Bravosi Cerveira⁵, Patricia Ashton-Prolla^{3,4,6,7}, Alessandro Bersch Osvaldt⁸⁻⁹, Maria Isabel Albano Edelweiss^{1,2}

1 - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brazil.

2 - Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre - RS, Brasil

3 - Programa de Pós-Graduação em Genética de Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brasil

4 - Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre - RS, Brasil

5 - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brasil

6 - Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre - RS, Brasil

7 - Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brasil

8 - Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Grupo de Vias Biliares e Pâncreas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre - RS, Brasil

9 - Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brazil.

Corresponding author:

Maria Isabel Albano Edelweiss, MD, PhD.

Serviço de Patologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos 2350. 90035-903 Porto Alegre RS Brazil

e-mail: mariaisabel.edelweiss@gmail.com

Tel.: + 55 51 3359-8313; Fax: + 55 51 3359-8001

ABSTRACT

Epigenetic deregulation may be involved in tumor cell biology, including cell growth, differentiation, tumor progression and cell death, and histone acetylation is a major regulatory mechanism of gene transcription. Patterns of global histone modifications have been recently suggested as outcome predictors in cancer patients, but few studies have been conducted on pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs). This study was designed to investigate the predictive value of histone acetylation modifications on pancreatic cancer. A retrospective clinicopathologic analysis was undertaken in 119 patients diagnosed with PDAC between 2005 and 2011, and immunohistochemistry performed with polyclonal antibodies against H4K12ac, H3K9ac and H3K18ac. Positive nuclear staining for each histone was measured as the intensity and expression, being classified into low or high-staining groups. Results were analyzed in relation to patients' clinicopathologic parameters. There was a positive relationship between tumor differentiation and H4K12ac high scores ($P < 0.05$) and staining with the three markers correlated positively with tumor stage ($P < 0.01$). Univariate analysis showed worse survival in patients with high detection levels of H4K12ac ($p = 0.038$) and H3K18Ac ($P = 0.033$). A backwards Cox proportional hazards model analysis revealed the independent prognostic effect of high H4K12ac and H3K18ac levels (hazard ratios of 1.6 and 1.7 respectively, $p < 0.05$), especially for patients at early stages of disease. We propose that acetylation of H4K12 and H3K18 may be considered valuable prognostic factors for pancreatic cancer, although the mechanism involved needs further investigation. Increasing insights into histone

acetylation modifications can ultimately generate new ideas for rational and molecularly-based diagnostic and therapeutic approaches.

Key words: Histone; histone-acetylation; pancreatic cancer and histone; immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma is one of the most malignant tumors, with a high lethality rate and for which few therapeutic options are available. This may be partially due to the notorious complexity of these tumors, which derive from multiple genetic aberrations and mixed cellular populations. This extraordinary complexity can also explain the heterogeneous clinical course observed in daily practice (Jones et al., 2008). Along with genetic events, tumor-associated epigenetic alterations are important determinants in the initiation and progression of pancreatic cancer and represent promising biomarkers and therapeutic targets (Lehrmann et al, 2002; Seligson et al, 2005; Manuyakorn et al, 2010). Epigenetic alterations include locus-specific changes in DNA methylation and histone modifications, which influence chromatin accessibility and gene activity. Histone modifications can affect the activation and repression of oncogenes and tumor suppressor genes (Elsheikh et al, 2009).

The acetylation of certain histones has been associated with transcriptional activation of genes as chromatin becomes more accessible to a number of transcriptional factors and coactivator complexes. On the other hand, deacetylation is associated with repressive transcription, which can silence tumor suppressor genes and result in a drive for tumor development and progression (Wade et al, 2001; Lehrmann et al, 2002). The imbalance between the process of acetylation and deacetylation of histones in promoter regions contributes to the deregulation of gene expression and has been associated

with carcinogenesis and progression in different cancers (Elsheikh et al., 2009), becoming the target of intense investigation. The consequence of the altered activity of histone-modifying enzymes has so far been linked to inappropriate expression of a few genes that might have a function in tumor biology (Tzao et al, 2009; Manuyakorn et al, 2010).

Global histone modification patterns can be predictive of clinical outcome in cancer as showed by some authors in recently studies. In prostate cancer (Seligson et al, 2005), H3K18 acetylation was positively correlated with increasing grade but inversely correlated with recurrence, suggesting that histone acetylation could be associated with better outcome. Equivalent results were lately found in both lung and kidney cancer patients (Seligson et al., 2009), with low levels of H3K128ac predicting poorer survival. In esophageal squamous cell carcinoma (Tzao et al., 2009), however, H3K18 acetylation was significantly associated with worse survival. In the same direction, high relative levels of histone acetylation were associated with favorable prognosis in breast cancer (Elsheikh et al, 2009) while hypoacetylation was associated with tumor progression from normal breast epithelium to invasive carcinoma (Suzuki et al., 2009).

The balance between acetylation and deacetylation leading to expression of oncogenes or silencing of tumor suppressor genes is not yet well understood in the route of pancreatic cancer. Manuyakorn et al (2010), studying pancreatic cancer tumors from patients at early stages, found that low cellular levels of H3K4 and H3K9 methylation were independent predictors of poor survival, as

well as low expression of H3K18 acetylation (<35% of cells) in patients with stage I and II. However, no further studies were designed to evaluate the role of other histone acetylated markers, such as H4K12 and H3K9, or the pattern of histone changes in patients with pancreatic advanced disease (stage III-IV).

Analysis of histone acetylation by immunohistochemistry stains may be useful in designing strategies to help in the prognostic evaluation and treatment development for pancreatic cancer. Here, we investigated the acetylation patterns of histone H3 lysine 9 (H3K9ac), histone H3 lysine 18 (H3K18ac) and histone H4 lysine 12 (H4K12ac), which were chosen because of limited reports in the literature on their correlation with pancreatic cancer and for sharing a cellular pattern that predicted tumor aggressiveness across multiple epithelial malignancies (Seligson et al, 2005; Ashktorab et al, 2009; Elsheikh et al., 2009).

MATERIALS AND METHODOS

Case Selection and Tumor Samples

The tissue samples comprised a cohort of 119 consecutive pancreatic cancers diagnosed from 2005 to 2011, derived from the routine clinical and surgical activities of Units the Department of Pathology and Group of Biliary Tract and Pancreas at Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). Histological samples were obtained from duodenopancreatectomies (25%), pancreatic biopsies (43.9%) and excision of metastatic pancreatic cancer lesions (31.1%). The immunohistochemical analyses were performed in

formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples stored in the Department of Pathology of HCPA, after approval by the Institutional Scientific and Ethics Committees Clinical variables were obtained from review of medical records and included: age at diagnosis, sex, tumor size and grade, lymph node status, occurrence of metastasis, resection margin involvement, treatment received (type of surgery, radiation therapy, and chemotherapy), disease free-survival and overall survival.

Immunohistochemistry for Histone Markers

Initial pilot tests were conducted to determine antibody dilutions according to the manufacturer's instructions and pattern of positive control slides, as indicated by the manufacturer and dependent on conditions of the laboratory (positive control) and without the primary antibody (negative control). The antibodies used included H3K18ac (Rabbit polyclonal to Histone H3acetyl K18) Abcam®; H3K9ac (Rabbit polyclonal to Histone H3acetyl K9) Abcam® and H4K12ac (Rabbit polyclonal to Histone H4acetyl K12) Abcam®. Sections were made of four posts in micrometers thick electrically charged plates and incubated at 60 ° C overnight. The blades were identified and dewaxed in xylol and then passed into ethyl alcohol in decreasing concentrations (100%, 85% and 75%) and washed in running water for five minutes to remove the paraffin. Antigen retrieval was performed following the recommendations of time and pH provided by the manufacturer using the equipment (Abcam®). After antigen retrieval, endogenous peroxidase was blocked and then incubated with the cuts

will be blocking protein (Abcam®) for five minutes at room temperature in a humid chamber. Section cuts were incubated with the primary antibodies (H3K9ac, H3K18ac and H4K12ac) for 90 minutes at room temperature and subsequently incubated with the secondary antibody for 30 minutes at room temperature. After washing in PBS, the sections were incubated with chromogen for 5 minutes, washed in running water and counter-stained with hematoxylin. Slides were washed again in running water, dehydrated and mounted with balsam and coverslips for microscopic analysis.

Scoring of the Immunohistochemical

Semi-quantitative assessment of the percentage of tumor cells with positive nuclear staining (0% to 100%) and intensity of staining (0, no staining; 1+, faint/barely appreciable staining; 2+, moderate staining; 3+, strong staining) was performed independently by two pathologists who were blinded to all clinicopathologic and outcome variables and then came to a consensus on the final score. Immunohistochemical staining was also evaluated by the modified Histo-score (H-score), which involves assessment of both the intensity of staining (0 to 3+) and the percentage of positive cells. The H-score is calculated as the sum of the percentage of stained tumor cells by their staining intensity and ranged from 0 to 300 and, as shown by Elsheikh et al (2009), enables stratification of sample cases into biologically relevant groups depending on different levels of detection, which could potentially be missed using only expression or intensity scoring systems.

Statistical analyses

The association between the histone markers and different clinicopathologic characteristics of the patients, including age, gender, tumor differentiation, stage, TNM category and tumor resection were evaluated by Pearson's correlation coefficient or χ^2 tests as appropriate. The cutoffs for the analysis of percentage of cells stained were determined and each tumor was assigned into a low- or high-level category as follows: H3K9ac <60% vs \geq 60%, H3K18ac <35% vs \geq 35%, H4K12ac <74% vs \geq 74%. For intensity, categories were dichotomized into low intensity (0-2+) or high intensity (\geq 3+). Tumor samples with H-scores (sum of expression and intensity) <100 for individual histone marks were designated as low detection, whereas scores \geq 100 were designated as high detection.

The Kaplan-Meier method was used for estimating probability of survival and survival curves were compared using the log-rank test. The Cox proportional hazard model was used to evaluate the association between various histone modifications and patient's survival. In addition to the histone patterns we included sex, age, T and N stage as potential confounders. Overall survival time was measured from the time of surgery or biopsy to the date of death or last follow-up. Disease-free survival time was measured from the date of histological diagnosis to the date of first disease-free failure event, defined as locoregional relapse, distant disease or death as a result of any cause. Significance was established at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS version 16.0.

RESULTS

A total of 119 patients with pancreatic cancer were included in this study: 56 (47.1%) were men and 63 (52.9%), women, median age at diagnosis was 66 years (range, 36-92 years, SD \pm 10.3) and median post-diagnosis follow-up was 14.2 months. Ninety patients (76%) died during the period of follow-up.

Among all patients included, 2.5% were in pathologic stage I, 23.3% were in pathologic stage II, 31.7% were in pathologic stage III, and 42.5% were in pathologic stage IV. In cases where information on tumor grade was available, 67.1% (55 of 82) of the carcinomas were well or moderately differentiated and 32.9% (27 of 82) were poorly differentiated.

Histone Acetylation Levels in Pancreatic Cancer

The staining pattern showed different levels of intensity across several cases, for all three markers, and only nuclear staining for the three histones was regarded as positive. Representative results of immunostaining expression and intensity for the three histone marker antibodies are shown in Figure 1. Frequencies of patients with the indicated global levels of each histone, for intensity and expression staining are shown in Figure 2. Median percentage of cells staining positively for H4K12ac, H3K9Ac and H3K18ac was 60% (\pm 26.9), 80% (\pm 21.2) and 65% (\pm 24.7), respectively. Acetylation of H3K9 was highly expressed (\geq 90% of cells) in 21.6% of cases, in contrast to H4K12ac that showed high expression only in 3.3% of tumors. Similarly, staining intensities of

H3K9ac were strong in $\geq 75\%$ of samples, while H4K12ac showed high avidity in 33.3%.

By comparing the staining levels in tumoral and histologically normal adjacent areas, we found significantly lower expression for acetylated histones in non-malignant tissues (data not shown). Furthermore, metastatic lesions showed higher levels of histone acetylation in comparison to normal and primary pancreatic tumors.

Global H3K9ac levels were significantly correlated with H3K18ac levels, and both were negatively correlated with the global H4K12 levels ($P < 0.05$).

Histone Acetylation Associates with Poor Prognosis

The relationship between the global levels of modified histones and the clinicopathologic features in 119 pancreatic cancer cases are shown in Table 1. Significant associations were found between baseline clinicopathologic parameters and dichotomized histone groups, especially for H4K12 acetylation. Global levels of the three histones were not significantly associated with patient age and sex. The global levels of H4K12ac assessed through H-Score were positively correlated with tumor grade ($P = 0.014$), whereas no association was observed for H3K9ac and H3K18ac H-Score or intensities. Significant associations were found between the global levels of all three histones and tumor stage. High H4K12ac detection ($H\text{-Score} \geq 100$) was strongly associated with advanced stages (III and IV, $p < 0.001$), as well as high H3K9ac and H3K18ac intensity levels ($p = 0.008$ and $p = 0.001$, respectively).

Histone Acetylation Predicts Poor Survival in Pancreatic Cancer

The median survival of the entire cohort was 10.4 months. High H4K12ac H-Score (≥ 100), as well as high H3K18ac intensity staining ($\geq 3+$) were both associated with significantly shorter survival using Kaplan-Meier estimates ($p=0.04$ and $p=0.03$, respectively; Figure 3).

Cox proportional multivariate analyses showed significant association between high H4K12ac H-Score and H3K18ac intensity staining and overall survival (Table 2). As expected, presence of nodal metastases and larger tumor size were also associated with shorter survival.

Since previous studies showed that low cellular histone levels can predict aggressive tumor behavior in subsets of patients with early stage pancreatic cancer (Manuyakorn et al., 2010), we performed similar subgroup analyses on patients with stage I and II tumors (Table 3). The prognostic significances of high H4K12ac expression (cutoff $\geq 74\%$) and high H4K12ac intensity score ($\geq 3+$) were significantly higher in early stage cases than in advanced ones (hazard ratios of 5.46 and 25.22 respectively, $p < 0.05$). For high H4K12ac H-Score detection levels there was a tendency for a stronger effect; however no statistical significance was reached. This may be due to the small sample size in this subgroup ($n=31$).

DISCUSSION

Similar to gene expression, epigenetic alterations have been recently used to identify prognostic factors and targets for therapy in cancer. In pancreatic cancer, methylation status has been well characterized (Omura et al., 2008; Tan et al., 2009; Vincent et al., 2011), but few reports have been published on the patterns and effects of histone acetylation. Considering this lack of data, we retrospectively analyzed histone acetylation modifications by immunohistochemistry and verified their role as outcome predictors in ductal pancreatic adenocarcinoma.

By studying a non-selected population predominantly of advanced pancreatic cancer patients, we found that different cellular histone patterns are associated with prognosis, with high levels of acetylation being linked to worse outcome. For H4K12ac marker, the H-Score seemed more predictive than expression or intensity whereas for H3k9ac and H3K18ac, staining avidity represented by intensity scores was more significant. These differential methods of testing enabled us to explore in a more reliable way the tumor samples, considering the most significant levels of detection, and what could have been missed using simpler scoring methods. Previous studies may have failed in detecting predictive power of histone modifications by using only the percentage of stained cells as scoring method.

Until now only one study has evaluated histone modifications as prognostic factors in pancreatic cancer (Manuyakorn et al., 2010), however they

didn't find much significance in the acetylation patterns, since H3K18ac was not strongly associated with overall survival in contrast to histone methylation represented by H3K4me2 and H3K9me2 markers. When performing a subgroup analysis with patients stage I and II, low H3K18ac characterized by percent of staining <35%, was significantly associated with worse survival ($p=0.018$), but no further correlations were found. In our study, on the other hand, low intensity H3K18ac staining associated with less advanced diseases at diagnosis (Table 3, $p < 0.05$) and better overall survival (Figure 4, $p=0.03$). These differences are worth exploring and may be due to disparities in population compositions, since the study of Manuyakorn et al. was limited to resectable and selected cases whereas ours presented a more general inclusion approach.

Global histone modification patterns can be predictive of clinical outcome as shown by some authors in recent studies. Seligson et al (2005) assessed the risk of prostate cancer recurrence through H4K12ac, H3K9ac and H3K18ac staining, with more than 65% of samples showing 90-100% staining of the tumor cells for the last two in contrast to H4K12ac expression (16%). This finding was equivalent to our results, since H4K12ac and H3K9ac showed different patterns of staining in pancreatic cancer samples. Similarly, histone acetylation was positively correlated with increasing tumor grade in prostate cancer, corresponding to our findings. The author argues that the higher levels of staining might be related to the increased proliferative capacity of undifferentiated tumors, which might be associated with increased gene activity. However, when analyzing the tumor-free survival in resected patients, H3K18

acetylation was significantly associated with better outcome. In a different study, with both lung and kidney cancer, Seligson et al also showed that lower levels of H3K18ac predicted significantly poorer survival probabilities in both cancer groups. In breast cancer, results also show high relative levels of H3K9 and H3K18 acetylation associated with a favorable prognosis and hypoacetylation associated with worse prognosis and tumor progression, with a marked reduction in staining levels from normal epithelium to invasive carcinoma (Elsheikh et. al., 2009; Suzuki et al., 2009)

This is not a global pattern in all the types of cancer, since we saw low levels of acetylation in normal pancreatic and peritumoral cells, in contrast to higher levels of expression and intensity in neoplastic cells. In colon, low expression of acetylated histones occurs in normal colonic biopsies and highly positive nuclear staining of epithelial cells in adenocarcinomas. Although with no statistical significance (Ashktorab et al., 2009).

In order to define if histone acetylation predicted clinical outcome, we performed Kaplan-Meier survival analyses and showed that high level of H4K12ac though H-Score (≥ 100) correlated significantly with decreased survival, as well as high H3K18ac intensity staining ($\geq 3+$). These results are similar to the histone acetylation predictive power in esophageal squamous cell carcinoma, in which low expression of H3K18ac significantly correlates with better prognosis (Tzao et al, 2009). While high H4K12ac didn't show significance in their study, we found a strong correlation with worse survival in our series. This association had a tendency to better correlate in stage I and II

pancreatic cancer ($p=0.075$), however due to the low number of patients in this subgroup, we were unable to do meaningful analyses between groups. Equivalent results were found by Tzao et al. in esophagus cancer, suggesting that these epigenetic events may serve as biomarkers either for advanced or earlier stages of cancer.

It is now well known that levels of histone acetylation, at a given region of chromatin, correlate with transcriptional activity (Grunstein et al, 1997). However, differences in H3 and H4 acetylation along a gene have also been reported showing that H3 hyperacetylation is more limited to the promoter region, whereas H4 hyperacetylation stretches for a much broader domain (Vignali et al., 2000b). These differences may lead to the heterogeneity in histone acetylation patterns across different tumors and different types of cancer, which adds to the complexity of changes in epigenome biomarkers and results in different findings across several studies. Also, gene-specific histone acetylation has been reported to run contrary to the overall state of modification, since in the promoter regions of actively transcribed genes, histones are found highly acetylated whereas the open reading frames (ORFs) harbor a lower level of acetylation (Pokholok et al., 2005). On the other hand, in non-activated genes, histones are usually hypoacetylated in the promoter region but very highly acetylated in the overall sequence (Sinha et al., 2006; Thomson et al., 2001). This can result in differences in the overall pattern of acetylation seen through immunohistochemistry, in which high levels of global nuclear acetylation staining coexist with hypoacetylated histones at the promoters of tumor suppressor genes, leading to repression of these genes and therefore

tumor progression. This could be one of the reasons for our findings of high global levels of acetylated histones in cases where low levels of tumor suppressor genes expression were expected.

Another possible explanation for the association of histone acetylation with worse outcome is the increased expression of growth receptors and oncogenes instead of tumor suppressors, since *KRAS* has an overriding role in pancreatic carcinogenesis. Other modifying factors such as the EGF receptor, c-MYC, TGF- β and HER-2/neu could also be having their gene expression induced by histone acetylation at their promoters; however no evidences are available linking histone modifications with induction or repression of these oncogenes (Lemoine et al., 1990; Sakorafas et al., 2000; Skoudy et al., 2011). Therefore, more studies are needed to distinguish the effect of histone acetylation on different genes and pathways associated with pancreatic cancer progression.

Conversely, considering histone modifications as consequence instead of cause of tumor progression, one possibility is that histone hyperacetylation represents a compensatory mechanism for repairing DNA damage, activated by caretaker and gatekeeper genes during carcinogenesis, in an attempt to control tumor growth and invasiveness. There is a growing body of evidence linking histone acetylation to DNA repair and recently it was determined that the histone acetyltransferase (HAT) complex NuA4, which acetylate several histones, is recruited to the site of double-strand breaks, along with its catalytic subunit Esa1, a HAT enzyme that acetylates histone H4 (Bird et al., 2002). It

seems that high levels of histone acetylation are induced for maintaining genome integrity and acetylated histones participate directly in the attempt of repairing broken chromatin

Studying the biological mechanisms that are the scaffold for epigenetic changes in pancreatic cancer enables a better understanding of its carcinogenesis, allowing correlations between the enzymatic activity of histone acetyltransferases and deacetylases and tumor progression. Fifty-six percent of pancreatic adenocarcinomas show positive immunohistochemical staining for histone deacetylase 1 (HDAC1), which remove acetyl groups from the histones; and the coexpression of HDAC1 and the transcription factor HIF1 was found to correlate with poor prognosis (Miyake et al. 2008). Whereas clear expression and functional data demonstrate an important role for HDACs in pancreatic ductal adenocarcinoma, the function of HATs is still unclear. Cell lines with the highest metastatic capacity reveals the lowest expression levels of the HAT entitled p300, suggesting a direct involvement of histone deacetylation enzymes in regulating metastasis (Mess et al., 2010). Various signaling pathways and transcription factors relevant for pancreatic cancer progression are controlled by acetylation and further detailed analysis are necessary to decipher the signaling pathways controlled by individual members of the acetylating/deacetylating machinery (Schneider et al., 2011).

The specific manner by which histone acetylation influences promoter activation and repression is not well characterized and needs further molecular and epigenomic investigation. The differences between histone modifications

may be important in defining patients groups to study different clinical outcomes and intervention strategies. Here we demonstrated that two histones modifications, H4K12 and H3K18 acetylation, correlated with worse prognosis and poor survival in pancreatic cancer, being independent prognostic factors for overall survival. The prognostic role of H3K9ac remains elusive, mandating further evaluation. Additional studies of histone modifications in pancreatic cancer can lead to a better comprehension of epigenetic mechanisms in carcinogenesis and provide the information necessary to develop for early diagnosis and therapeutics strategies.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq/Rede Genoprot (Grant #559814/2009-7), CAPES and Fundo de Incentivo à Pesquisa - FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Grant #10-0418). Prof. Maria Isabel Albano Edelweiss, Patricia Ashton-Prolla and Alessandro Bersch Osvaldt are investigators of CNPq. Patricia Izetti received a grant from CAPES and Alex Pritzel dos Santos received a grant from CNPq.

We thank Ms. Ana Lucia Abujamra for ideas during conception, Ms. Flávia Giusti for help with tissue immunohistochemistry staining, Mr. Diego Paskulin for help with figures editing and and Ms Daniela Benzano for help with the statistical analyses.

REFERENCES

- ALMOGUERA C, SHIBATA D, FORRESTER K, MARTIN J et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988; (53):549-554
- ASHKTORAB H, BELGRAVE K et al. Global histone H4 acetylation and HDAC2 Expression in colon adenoma and adenocarcinoma *Dig Dis Sci* 2009; 54(10): 2109-2117
- BIRD AW, YU DY, PRAY-GRANT MG, QIU Q, HARMON KE, MEGEE PC, GRANT PA, SMITH MM, CHRISTMAN MF. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* 2002; 419:411-415.
- D'ALESSIO AC, SZYF M. Epigenetic: the bilateral relations between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol*. 2006; 84:463-76
- ELSHEIKH SE, GREEN AR, RAKHA EA et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors and patient outcome. *Cancer Res* May 2009; 69(9): 3802-09
- FISCHLE W, WANG Y, ALLIS CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15:172-83
- GRUNSTEIN M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389:349-52
- JEMAL A, SIEGEL I. R, WARD E. et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
- JONES B, SU H, BHAT A et al. The Histone H3K79 Methyltransferase Dot1L Is Essential for Mammalian Development and Heterochromatin Structure. *PLoS genetics*, 2008
- KOUZARIDES T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007; v.128, n.4, Feb 23, p.693-705.
- KUMAGAI T, AKAGI T, DESMOD JC. et al. Epigenetic regulation and molecular characterization in pancreatic cancer cells. *Inst J cancer* 2009; 124: 827-833
- KUO MH, ALLIS CD. Role of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 1998; 20:615-26
- LEHRMANN H, PRITCHARD LL, HAREL-BELLAN A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv cancer Res* 2002; 86:41-65
- LEMOINE NR, HALL PA. Growth factors and oncogenes in pancreatic cancer. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1990;4(4):815-32.
- MANUYAKORN A, PAULUS R, FARRELL J et al. Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic Adenocarcinoma: Results from RTOG 9704. *Journal of Clin oncology* March 2010; 28(8): 1358-65
- MEES ST, MARDIN WA, WENDEL C, BAEUMER N, WILLSCHEER E, SENNINGER N et al. EP300-a miRNA-regulated metastasis suppressor gene in ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Int J Cancer*. 2010;126:114-24.
- MILUTIOVIC S, ZHUANG Q, SZYF M. Proliferating cell nuclear antigen associates with histone deacetylase activity, integrating DNA replication and chromatin modification. *The journal of biological chemistry* June 2002; 277(23): 20974-78

- MIYAKE K, YOSHIZUMI T, IMURA S, SUGIMOTO K, BATMUNKH E, KANEMURA H et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas*. 2008;36:e1-9.
- OMURA N, LI CP, LI A, HONG SM, WALTER K, JIMENO A, HIDALGO M, GOGGINS M. Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7(7):1146-56.
- POKHOLOK DK, HARBISON CT, LEVINE S et al. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 2005;122:517-27.
- ROSA HS, CALDAS C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005; 41:2381-402
- SAKORAFAS GH, TSIOTOU AG. Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumor suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer Treatment Reviews* 2000; 26: 29-52
- SCHNEIDER G, KRÄMER OH, SCHMID RM, SAUR D. Acetylation as a Transcriptional Control Mechanism - HDACs and HATs in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Gastrointest Canc* 2011 ; 42:85-92.
- SELIGSON DB, HORVATH S, McBRIAN MA et al. Global Levels of Histone modification predict prognosis in different cancers. *The Am. Journal of Pathology*, May 2009; Vol. 174, n° 5
- SELIGSON DB, HORVATH S, SHI T et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature/Letters*, 2005; vol 435/30 june
- SKOUDY A, HERNÁNDEZ-MUÑOZ I, NAVARRO P. Pancreatic ductal adenocarcinoma and transcription factors: role of c-Myc. *J Gastrointest Cancer*. 2011; 42(2):76-84.
- SINHA I, WIREN M, EKWALL K. Genome-wide patterns of histone modifications in fission yeast. *Chromosome Res* 2006;14:95-105
- SUZUKI J, YUNN-YI C, SCOTT GK, et al. Protein Acetylation and Histone Deacetylase Expression Associated with Malignant Breast Cancer Progression *Clin Cancer Res* 2009;15:3163-3171. April, 2009.
- TAN AC, JIMENO A, LIN SH, WHEELHOUSE J, CHAN F, SOLOMON A, RAJESHKUMAR NV, RUBIO-VIQUEIRA B, HIDALGO M. Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol* 2009 (5-6):425-38.
- THOMSON S, CLAYTON AL, MAHADEVAN LC. Independent Dynamic Regulation of Histone Phosphorylation and Acetylation during Immediate-Early Gene Induction. *Cell* 2001 8(6):1231-41.
- TZAO C, TUNG HJ, JIN JS et al. Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mod Pathol* 2009; 22:252-260
- VIGNALI M, STERGER DJ, NEELY KE, WORKMAN JL. Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *EMBO J* 2000 (19): 2629-2640.
- VINCENT A, OMURA N, HONG SM, JAFFE A, ESHLEMAN J, GOGGINS M. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011 17(13):4341-54.
- WADE, PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Human Molecular Genetics* 2001; 10(7): 693-98

TABLES

Table 1. Correlation of different clinicopathologic features with H4K12, H3K9 and H3K18 acetylation patterns.

Characteristic features	H4K12ac HSCORE pattern		H3K9ac intensity pattern		H3K18ac intensity pattern		P value
	Low detection (<100) No. (%)	High detection (≥100) No. (%)	Low detection (<3+) No. (%)	High detection (≥3) No. (%)	Low detection (<3+) No. (%)	High detection (≥3+) No. (%)	
Mean age at diagnosis (±SD, n=119)	63.06 ± 9.1	66.46 ± 10.8	64.5 ± 9.8	65.1 ± 10.4	65.9 ± 8.2	64.9 ± 10.7	0.078
Gender (n=119)							
Male	26 (51.0)	30 (44.1)	15 (51.7)	41 (45.6)	34(54.0)	22(39.3)	0.111
Female	25 (49.0)	38 (55.9)	14 (48.3)	49 (54.4)	29(46.0)	34(60.7)	
Tumor differentiation (n=82)*							
Well and moderate	30 (81.1)	25 (55.6)	16 (80.0)	39 (62.9)	28(68.3)	27(65.9)	0.817
Poor	7 (18.9)	20 (44.4)	4 (20.0)	23 (37.1)	13(31.7)	14(34.1)	
Tumor stage (n=118)							
T1-T2	9 (17.6)	6 (9.0)	4 (13.8)	11 (12.4)	11(17.5)	4(7.3)	0.099
T3-T4	42 (82.4)	61 (91.0)	25 (86.2)	78 (87.6)	52(82.5)	51(92.7)	
Mean tumor size (± SD, n=119)	4.14 ± 1.8	4.16 ± 1.9	4.04 ± 1.2	4.16 ± 1.9	4.5 ± 2.0	4.03 ± 1.9	0.862
Lymph node status (n=110)							
N0	27 (56.3)	30 (48.4)	16 (55.2)	41 (50.6)	32(52.5)	25(51.0)	0.882
N1	21 (43.8)	32 (51.6)	13 (44.8)	40 (49.4)	29(47.5)	24(49.0)	
Metastasis status (n=119)							
M0	35 (68.6)	34 (50.0)	21 (72.4)	48 (53.3)	42(66.7)	27(48.2)	0.042
M1	16 (31.4)	34 (50.0)	8 (27.6)	42 (46.7)	21(33.3)	29(51.8)	
Tumor Stage (n=119)							
I-II	23 (45.1)	8 (11.8)	13 (44.8)	18 (20.0)	24 (38.1)	7 (12.5)	0.001
III-IV	28 (54.9)	60 (88.2)	16 (55.2)	72 (80.0)	39 (61.9)	49 (87.5)	
Tumor resection (n=119)							
Yes	24 (47.1)	5 (7.4)	10(34.5)	19(21.1)	21(33.3)	8(14.3)	0.016
No	27 (52.9)	63 (92.6)	19(65.5)	71(78.9)	42(66.7)	48(85.7)	
Margin status (n=29)							
Negative	14 (58.3)	1 (20.0)	6(60.0)	9(47.4)	13(61.9)	2(25.0)	0.080
Positive	10 (41.7)	4 (80.0)	4(4.0)	10(52.6)	8(38.1)	6(75.0)	

SD = standard deviation

* Assessed only in cases with primary tumor tissue, not described in metastatic tissues.

Table 2. Multivariate proportional hazards analyses of overall survival.

Histone acetylation	Overall Survival		
	Adjusted HR*	95% CI	P value
High H4K12ac H-score (≥ 100)	1.600	1.05 to 2.55	0.049
High H3K9ac H-score (≥ 100)	1.148	0.60 to 2.18	0.673
High H3K18ac H-score (≥ 100)	0.916	0.57 to 1.52	0.729
High H4K12ac expression ($\geq 74\%$)	1.148	0.60 to 2.18	0.673
High H3K9ac expression ($\geq 80\%$)	1.174	0.76 to 1.83	0.476
High H3K18ac expression ($\geq 35\%$)	0.873	0.52 to 1.45	0.600
High H3K9ac intensity ($\geq 3+$)	1.281	0.77 to 2.13	0.339
High H3K18ac intensity ($\geq 3+$)	1.705	1.09 to 2.68	0.020
High H4K12ac intensity ($\geq 3+$)	1.287	0.80 to 2.06	0.298

* The following covariates were used: (1) T stage (T1-T2 v T3-T4), (2) nodal involvement (no v yes), (3) tumor differentiation (not poor v poor), (4) sex (female v male)

Table 3. Multivariate proportional hazards analyses of overall survival for stages I and II pancreatic cancer (n=31).

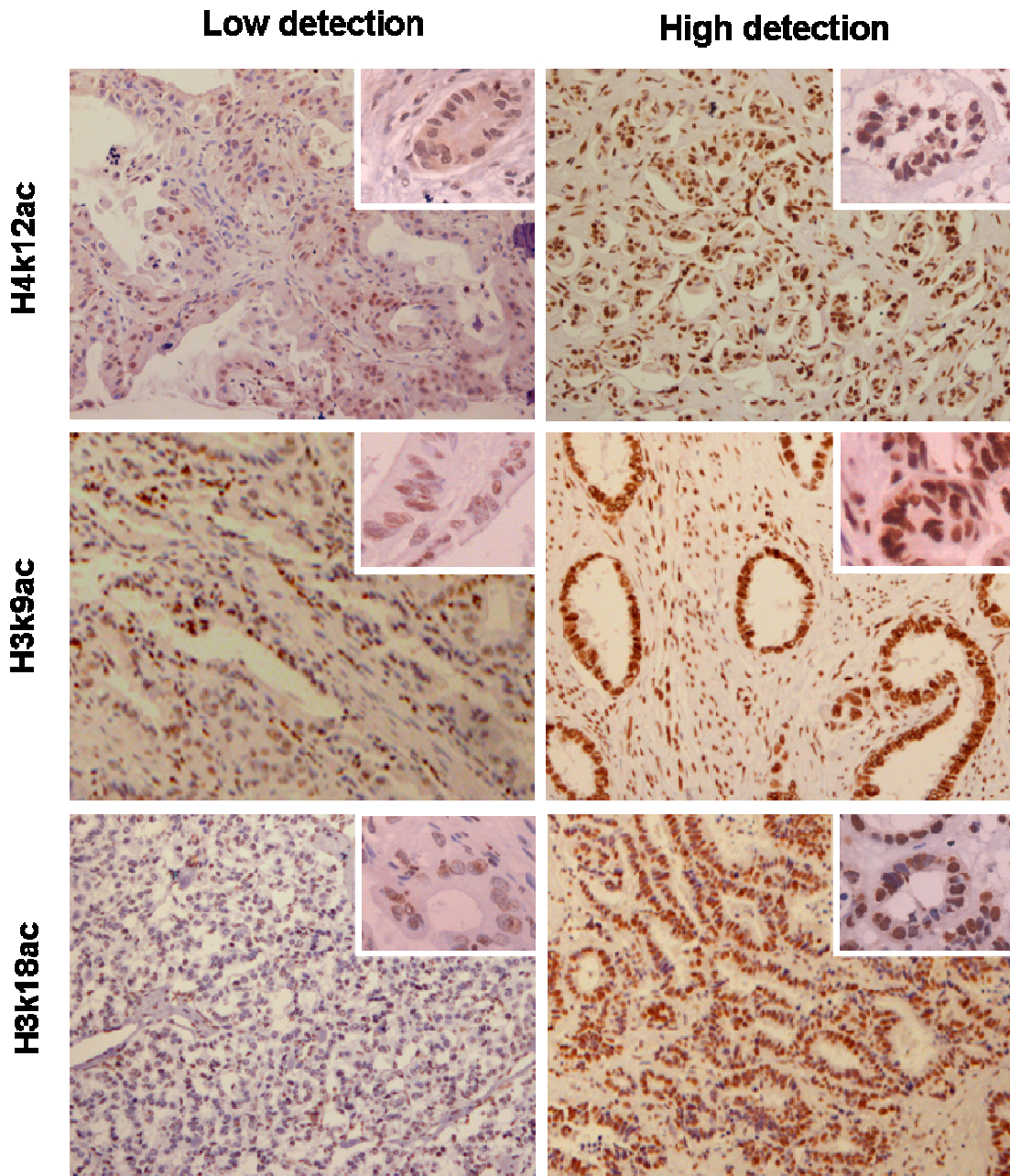
Histone acetylation	Overall Survival		
	Adjusted HR*	95% CI	P value
High H4K12ac H-score (≥ 100)	2.526	0.91 to 7.01	0.075
High H3K9ac H-score (≥ 100)	0.694	0.14 to 3.35	0.649
High H3K18ac H-score (≥ 100)	1.927	0.52 to 7.09	0.324
High H4K12ac expression ($\geq 74\%$)	5.456	1.26 to 23.06	0.023
High H3K9ac expression ($\geq 80\%$)	1.610	0.59 to 4.41	0.356
High H3K18ac expression ($\geq 35\%$)	2.585	0.62 to 10.85	0.195
High H3K9ac intensity ($\geq 3+$)	1.376	0.53 to 3.61	0.516
High H3K18ac intensity ($\geq 3+$)	3.128	0.808 to 12.12	0.099
High H4K12ac intensity ($\geq 3+$)	25.22	3.59 to 177.26	0.001[†]

* The following covariates were used: (1) T stage (T1-T2 v T3-T4), (2) nodal involvement (no v yes), (3) tumor differentiation (not poor v poor), (4) sex (female v male)

[†] Only two among 31 Stage I and II patients presented a H4K12ac intensity score $\geq 3+$ and both had less than one month overall survival.

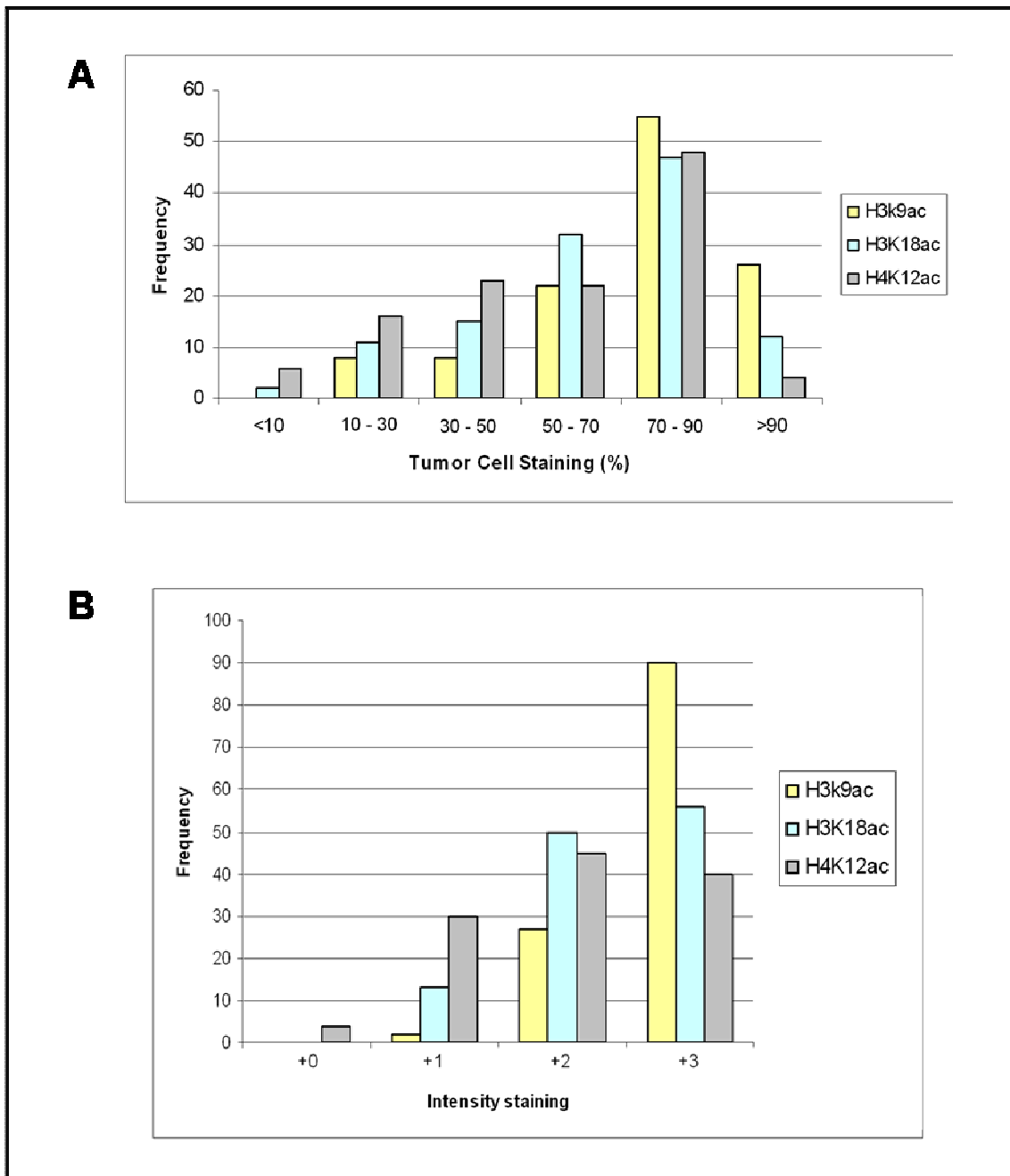
FIGURES

Figure 1.



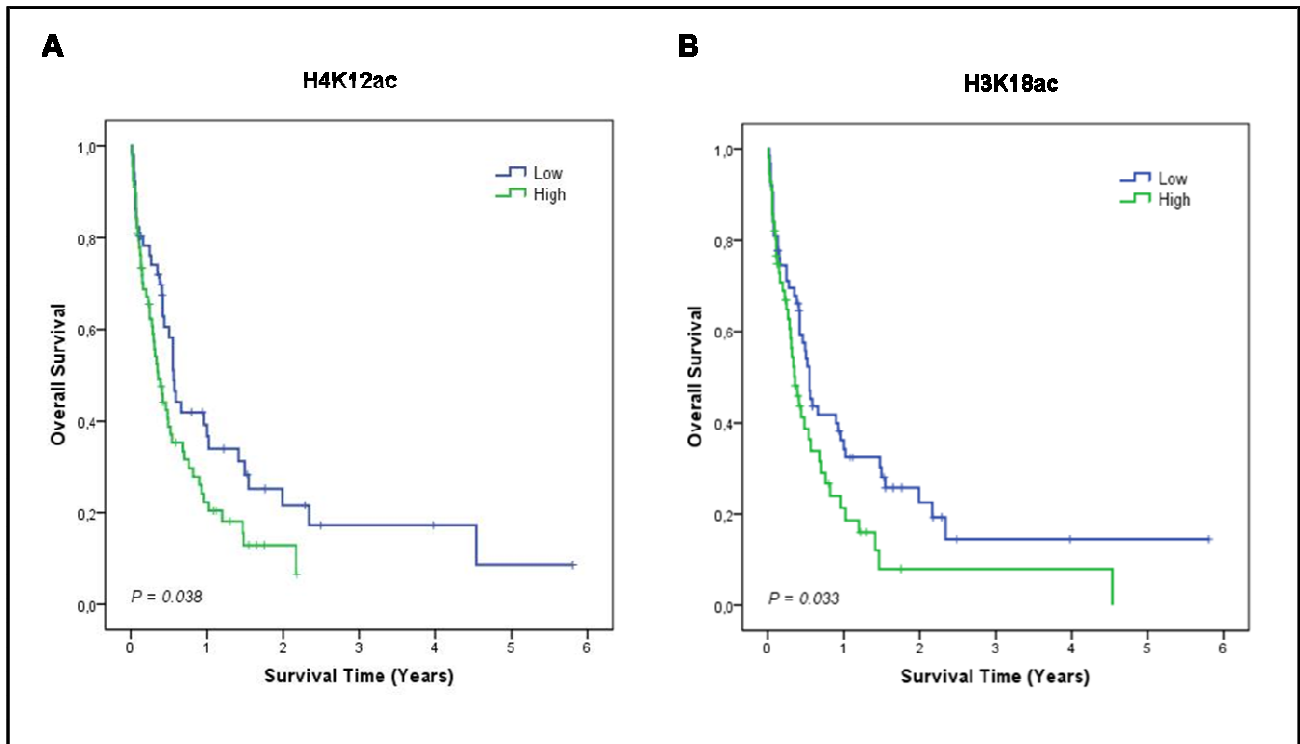
Immunohistochemical analysis of histone modification in pancreatic cancer samples. Expression staining is represented in the global panels on 200x while intensity staining is in the reduced panel on 400x. Representative examples of low (left) and high (right) detection levels of nuclear staining for H4K12ac, H3K9ac and H3K18ac

Figure 2.



Distribution of patterns of staining for each histone and the corresponding

Figure 3.



Overall survival on the basis of histone modification. A) H4K12ac H-Score staining (low: <100; high: ≥ 100). B) H3K18ac intensity level (low: <3+; high: $\geq 3+$). P-value is for log-rank tests.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Semelhante à expressão gênica, alterações epigenéticas têm sido recentemente utilizadas para identificar fatores prognósticos e alvos terapêuticos em câncer. No câncer de pâncreas, a metilação do DNA vem sendo bem caracterizada, mas há poucos relatos publicados sobre os padrões de acetilação das histonas. Considerando-se essa insuficiência de dados, analisou-se retrospectivamente o padrão de acetilação das histonas por imuno-histoquímica e verificou-se o seu papel como preditores do desfecho em adenocarcinoma ductal pancreático. Ao estudar uma população não selecionada de pacientes com câncer avançado de pâncreas, descobriu-se que diferentes padrões de acetilação estão associados com o prognóstico desta neoplasia, com altos níveis de acetilação (alta expressão) correlacionando-se com pior prognóstico.

Análises dos padrões de modificação de acetilação das histonas pela técnica de imuno-histoquímica podem ser úteis na elaboração de estratégias para ajudar na avaliação prognóstica e tratamento para o câncer de pâncreas (Tzao et al, 2009;. Elsheikh et al, 2009). Diante disso, foram investigados os padrões de acetilação das histonas H3K9ac, H3K18ac e H4K12ac, levando em consideração os poucos relatos da literatura sobre a relação dessas proteínas com o câncer de pâncreas e, ainda, pelas mesmas compartilharem de um padrão celular que prediz agressividade tumoral através de múltiplas neoplasias malignas epiteliais (Seligson et al, 2005; Ashktorab et al, 2009). Embora alguns estudos já tenham associado a relação das proteínas Histonas com a carcinogênese, o desequilíbrio entre acetilação e desacetilação, o que leva a expressão de oncogenes ou silenciamento de genes supressores tumorais, ainda não é bem compreendido na rota de câncer pancreático, necessitando, assim, de estudos adicionais e complementares aos até então publicados.

Manuyakorn et al (2010), ao estudar tumores de pâncreas de pacientes em estágios iniciais, descobriu que níveis celulares baixos de metilação de H3K4 e H3K9 foram preditores independentes de pior sobrevida, assim como a baixa expressão de acetilação de H3K18 em pacientes em estágio I e II. No entanto, nenhum estudo foi desenhado para avaliar as modificações das histonas que tendem a mostrar um padrão diferente de expressão, como acetilação da H4K12, ou ainda alterações das histonas em pacientes com doença pancreática avançada (estágio III-IV).

Estudos recentes apresentam que o padrão global de acetilação das histonas pode ser preditivo de desfechos clínicos, como no câncer de próstata, em que Seligson et al(2005) demonstrou que a acetilação da H3K18 foi positivamente correlacionada com maior grau tumoral e com chance de recorrência, bem como no carcinoma de células escamosas do esôfago, no qual Tzao et al. (2009) mostrou que níveis altos de expressão de H3K18ac foi significativamente associado com pior sobrevida. Elsheikh et. al.(2009), no entanto, apresentou que no câncer de mama os resultados são divergentes, com uma associação positiva entre hiperacetilação e prognóstico favorável. Da mesma forma, a hipoacetilação foi associada a um pior desfecho, expondo uma redução acentuada nos níveis de acetilação à medida que a neoplasia progredia do epitélio normal ao carcinoma invasivo.

Os níveis elevados de expressão para acetilação associados com pior sobrevida evidenciados pelos autores citados e pelo presente Trabalho sugerem algumas possibilidades. Uma possível explicação para a associação do aumento da acetilação das histonas com pior sobrevida é o aumento da expressão de oncogenes ao invés de genes supressores de tumor, como o Kras, que tem um papel importante na carcinogênese pancreática, e a capacidade proliferativa desses tumores. Além disso, considerando as modificações das histonas como consequência em vez de causa da progressão tumoral,

como até então se pensava, é que a indução de hiperacetilação pode ser um mecanismo compensatório para o reparo do DNA devido a uma instabilidade genômica causada pelo desenvolvimento do tumor. Isto levaria à ativação de genes responsáveis e “gatekeepers” em uma tentativa de controlar o crescimento do tumor e invasão, e para isso, a transcrição precisa ser ativada, com conseqüente hiperacetilação do gene promotor.

Outra maneira de tentar entender esse processo é que os níveis de acetilação das histonas, em uma determinada região da cromatina, se relacionam com a atividade transcricional (Grunstein et al, 1997). No entanto, as diferenças de acetilação das histonas H3 e H4 ao longo de um gene também foram relatadas mostrando que a hiperacetilação da H3 é mais limitada à região promotora, enquanto a hiperacetilação da H4 estende-se para um domínio muito mais amplo (Vignali et al., 2000b). Estas diferenças podem levar à heterogeneidade nos padrões de acetilação das histonas em diferentes tipos de tumores, o que aumenta a complexidade das mudanças em biomarcadores epigenéticos e resulta em diferentes achados por diversos estudos. Também, a acetilação de histonas na região de genes específicos parece apresentar um padrão contrário ao estado global de modificações na sequência, pois nas regiões dos genes promotores ativamente transcritos, as histonas apresentam altos níveis de acetilação, enquanto no resto da sequência codificadora apresentam baixos níveis de acetilação. Por outro lado, nas regiões de genes não-ativados as histonas estão normalmente hipoacetiladas, mas acetiladas na sequência geral. Isto pode se refletir no padrão de acetilação encontrado na imunohistoquímica, em que altos níveis de expressão de histonas acetiladas podem estar associados à hipoacetilação ao nível do gene promotor, com silenciamento dos genes supressores a despeito da acetilação presente nos outros pontos da sequência. Esse silenciamento contribuiria para a progressão tumoral e correlacionaria-se com menor diferenciação, maior ocorrência de metástases e menor sobrevida.

A maneira específica como acetilação das histonas influencia a ativação ou repressão do gene promotor ainda não está bem caracterizada e, por isso, necessita de mais contínua investigação molecular e epigenética. As diferenças entre as modificações das histonas faz-se importante na definição de grupos de pacientes com diferentes desfechos clínicos. Foi demonstrado ao longo da Pesquisa que a acetilação de duas histonas (H4K12ac e H3K18ac) correlacionam-se a pior prognóstico e menor sobrevida e podem ser um fator prognóstico independente para sobrevida global em câncer de pâncreas. O papel preditivo da H3K9ac permanece incerto, exigindo, então, futuras outras investigações. Estudos adicionais das modificações das histonas no câncer de pâncreas possibilitarão melhor entendimento sobre os mecanismos epigenéticos na carcinogênese a fim de fornecer subsídios de entrada para diferentes estratégias de diagnóstico e de terapêutica. O presente estudo, no entanto, apresenta limitações que restringem chegar a tais inferências e suscita questionamentos, os quais embasarão novas pesquisas.

7 ANEXOS

7.1.

PROTOCOLO DE PESQUISA: UTILIZAÇÃO DO ESCORE DE ALLRED PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS HISTONAS EM ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

NÚMERO AP: _____
OBSERVAÇÕES: _____

	INTENSIDADE	EXPRESSÃO	%
H3K9	/3	/5	
H3K18	/3	/5	
H4K12	/3	/5	

INTENSIDADE:

- 0 = Sem reatividade
- 1 = Fraco
- 2 = Moderado
- 3 = Forte

EXPRESSÃO:

- 1 = <1% marcação nuclear
- 2 = 1-10% marcação nuclear
- 3 = 11-33% marcação nuclear
- 4 = 34-66% marcação nuclear
- 5 = 67-100% marcação nuclear

7.2.

HOSPITAL DE CLÍNICA DE PORTO ALEGRE

**SEVIÇO DE CIRURGIA DO APARELHO DIGESTIVO
EQUIPE DE PÂNCREAS E VIAS BILIARES
TUMORES DA CONFLUÊNCIA BILIO-PANCREÁTICA - AVALIAÇÃO INDIVIDUAL**

IDENTIFICAÇÃO

Nome _____ Prontuário: _____
 Sexo (M) (F) Cor (B) (P) (A) (I) Estado Civil (S) (C) (V) (D) Profissão _____
 Endereço _____
 Cidade _____ Naturalidade _____
 Fone _____
 Data de Nascimento ____/____/____ Idade: _____
 Data da Internação ____/____/____ Data de Alta ____/____/____

QUADRO CLÍNICO

Início dos sintomas _____ em meses.

- () Dor abdominal () Dor dorsal () Icterícia () Colangite () Emagrecimento
 () Colúria () Vômitos () Prurido () Acolia () Massa abdominal

Doenças associadas

- () Endócrina. Qual? _____
 () Cardiopatia. Qual? _____
 () Pneumopatia. Qual? _____
 () Doença do aparelho digestivo. Qual? _____
 () Neoplasia. Qual? _____
 () Outras. Qual? _____
 () Alergias. Qual? _____

Emagrecimento ____ kg em ____ (meses/semanas)

- () Tabagismo Tempo/frequência: _____
 () Alcoolismo Tempo/frequência: _____
 () Cirurgia abdominal prévia Qual? _____
 () História familiar de neoplasia Qual? _____

Exame físico

Peso: _____ Kg Altura: _____ m IMC: _____ Kg/m²
 () Icterícia () Dor abdominal () Massa abdominal palpável () Ascite () LN periféricos

EXAMES PRÉ-OPERATÓRIOS**Laboratoriais**

Ht	TTPA	FA	Glicemia jejum
Hb	TGP	Gama GT	Albumina
Leucócitos	TGO	LDH	Transferrina
Plaquetas	BT	Lípase	CEA
INR	BD	Amilase	CA 19-9

Imagem**a) Eco abd**

- () massa ____x____x____cm () sólida () cística () mista

Local _____

- () dilatação de vias biliares () Intra____cm () Extra____cm
 () Colelitíase () Coledocolitíase () Metástases hepáticas () Ascite
 () Outras lesões: _____

b) Tomografia Computadorizada de Abdômen

- () Lesão ____x____cm () sólida () cística () mista.

Local _____

- () Dilatação de vias biliares () Intra-hepáticas () Extra-hepáticas () Colelitíase
 () Coledocolitíase
 () LNS Onde: _____
 () Metástase Onde: _____

Invasão vascular Venosa _____ Arterial _____

Outras lesões

c) Ressonância Nuclear Magnética do Abdômen

Vias biliares: normais dilatadas lesão _____

Lesão: pâncreas figado outra. Qual: _____

Descrição da lesão: _____

Hipótese diagnóstica: _____

d) Colangiopancreatografia Endoscópica Retrógrada

Tumor à duodenoscopia Colangite Cateterização da papila Pré-corte

Dilatação via biliar Intra-hepática Extra-hepática Papilotomia

Colocação de prótese. Tipo _____ Imagem do duplo ducto

RISCO NUTRICIONAL: Perda de peso >10% Transferrina <200 Albumina <3,5

RISCO CARDIOVASCULAR: CI ICC Arritmia AVC

RISCO PULMONAR: DPOC

OUTRO RISCO: _____

ASA: I II III IV V IV

ESTADIAMENTO PRÉ-OPERATÓRIO T _____ N _____ M _____ E: _____

TRATAMENTO

Não cirúrgico

Drenagem biliar endoscópica

Drenagem biliar transparieto-hepática

Quimioterapia neoadjuvante Tempo e fármacos: _____

Quimioterapia adjuvante Tempo e fármacos: _____

Quimioterapia paliativa Tempo e fármacos: _____

Radioterapia

Outro Qual: _____

Cirúrgico

Data ____/____/____

Duodenopancreatectomia clássica ou de Whipple

Duodenopancreatectomia com preservação de piloro

Pancreatectomia corpo cauda total

Anastomose biliodigestiva colecisto coledocojejuno hepáticojejuno

Anastomose gastroenteroanastomose ômega + Braun "y" de Roux

Ampulectomia

Esplenctomia

Alcoolização do plexo celíaco

SNE

Laparotomia/Laparoscopia de estadiamento

Outro _____

Congelação (peça) _____

Diagnóstico _____

Congelação (peça) _____

Diagnóstico _____

Tumor palpável Dimensão _____ x _____ cm

Localmente avançado VP VMS VC AMS Outro: _____

Tempo de cirurgia _____ h _____ min

Transfusão de sangue sim não Quanto? _____ ml

Sítio do tumor

Pâncreas Papila Duodeno Vias biliares

Histologia

Adenocarcinoma ductal Cisto adenocarcinoma mucinoso Adenoma seroso

Tumor sólido pseudopapilar Cisto adenocarcinoma seroso Carcinoma indiferenciado

Carcinoma mucinoso papilar intraductal Tumor neuroendócrino

() Outras neoplasias _____

() PAIN _____

Tamanho do tumor _____ x _____ cm

Margens () Livres () Comprometidas

Ressecção () R0 () R1 () R2

Invasão Perineural () Sim () Não

Outra invasão. Qual: _____

Grau de Diferenciação

() Bem diferenciado / Grau 1

() Moderadamente diferenciado / Grau 2

() Pouco diferenciado / Grau 3

TNM

() Tis:

() T1: tumor limitado ao pâncreas < ou = 2cm

() T2: tumor limitado ao pâncreas > 2cm

() T3: tumor além do pâncreas sem envolver plexo celíaco ou artéria mesentérica superior

() T4: tumor envolvendo o plexo celíaco ou a artéria mesentérica superior

() NX: linfonodos regionais não podem ser acessados

() N0: linfonodos negativos

() N1: presença de metástase linfonodal

() M0: Ausência de metástases à distância

() M1: Presença de metástases à distância

Estádio pós-operatório

() I

() II

() III

() IV

Tempo de Internação _____ dias

() **UTI durante internação** _____ dias

Complicações clínicas

() Infecções respiratórias () Sepse

() ITU

() TVP

() Embolia

() Outras _____

Complicações cirúrgicas

() Fístula: () Biliar () Digestiva () Pancreática

Débito () entre 50 e 100ml/dia () <500ml/dia () >500ml/dia

() Infecção FO () Deiscência de parede () Abscesso intrabdômnal

()

Outras _____

Tratamento das complicações

() CTI () Antibiótico _____

() Punção _____

() Reoperação _____

Óbito

() Pós-operatório (até 30 dias) Tempo _____ Causa _____

() Tardio Tempo _____ Causa _____

Segmento _____

Última consulta ambulatorial Data: __/__/__

OBS: _____

() Adjuvância Quimioterapia () Sim () Não _____

Radioterapia () Sim () Não _____

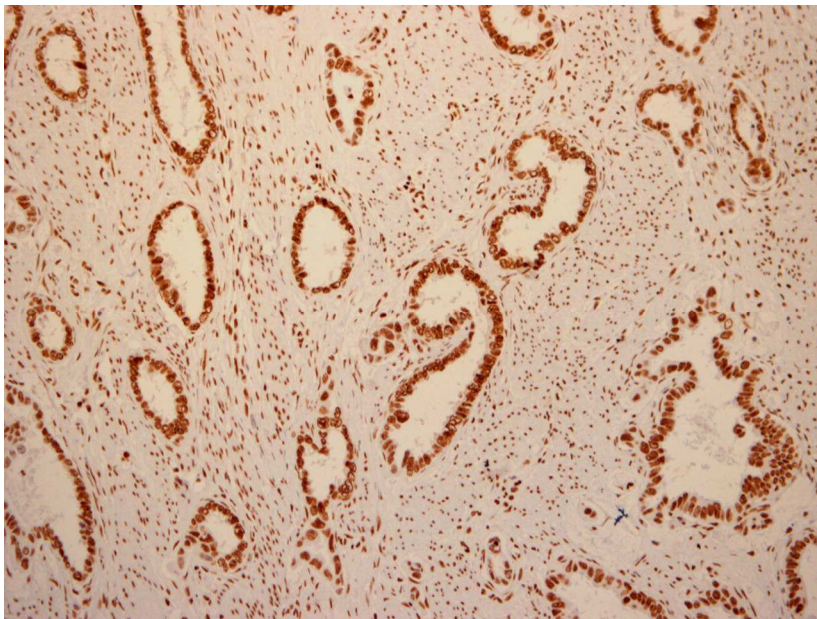
() Quimioterapia Paliativa _____

() Radioterapia Paliativa _____

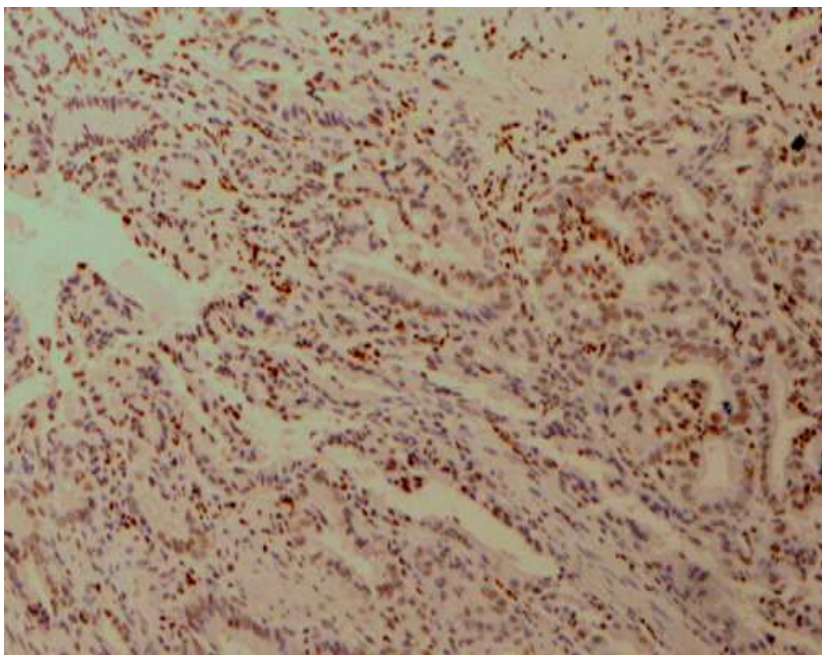
() Recidiva durante o seguimento data __/__/__

Tipo de recidiva () Local/regional _____ () Sistêmica _____

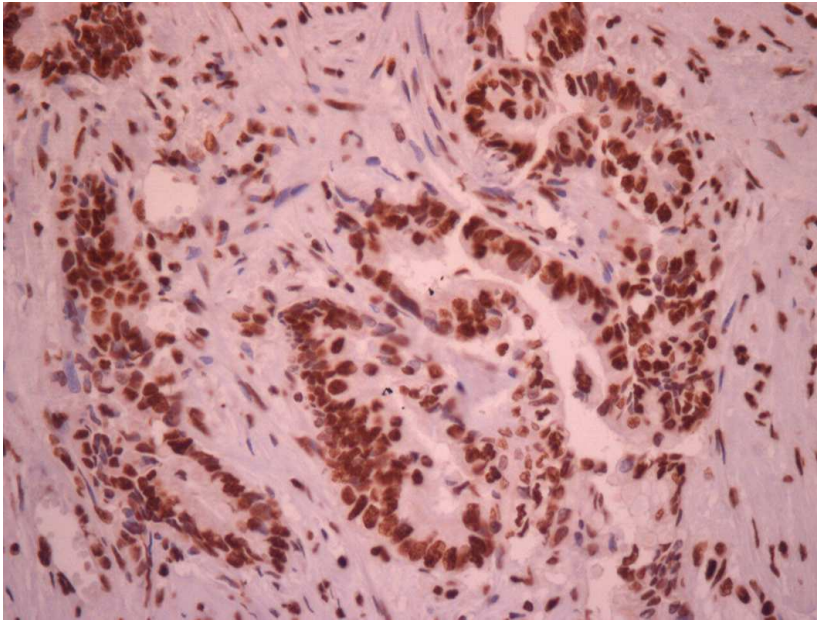
7.3. H3K9 expressão alta



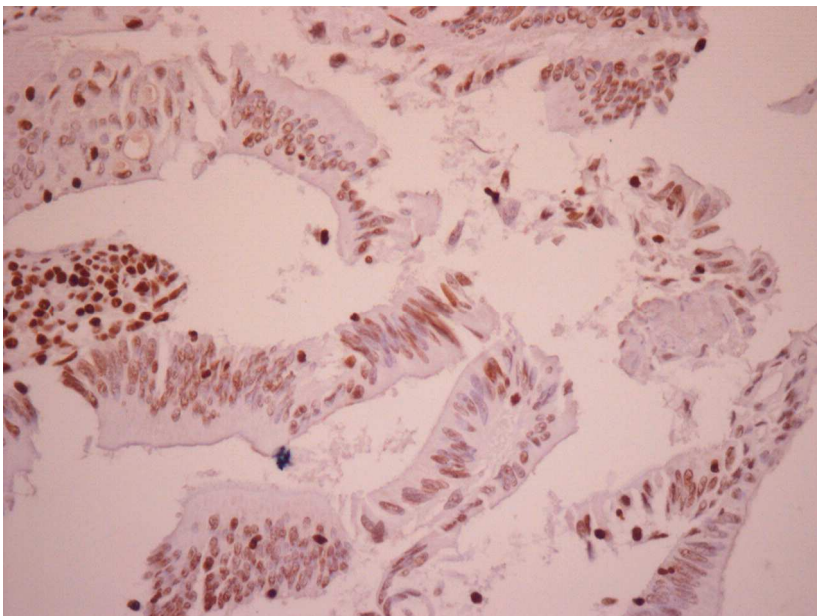
7.4. H3K9 expressão baixa



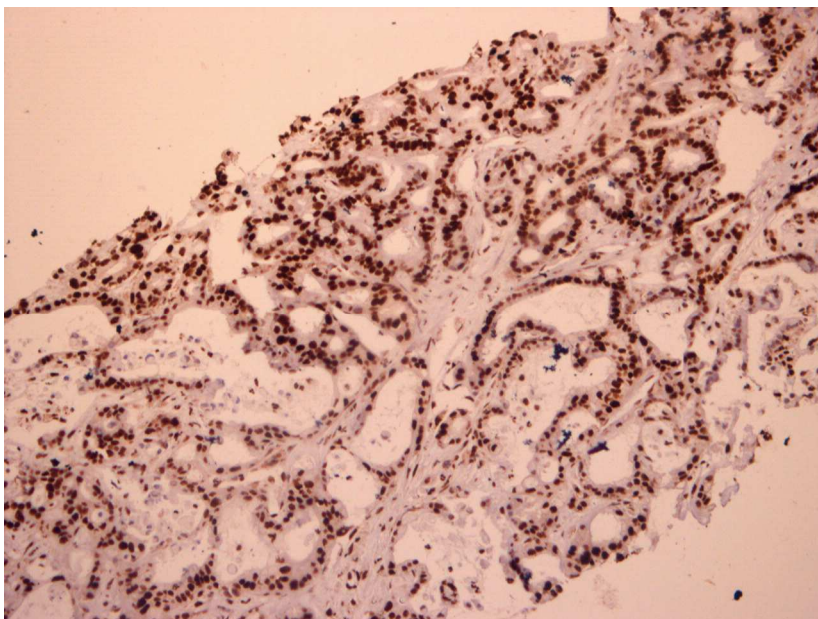
7.5. H3K9 intensidade forte



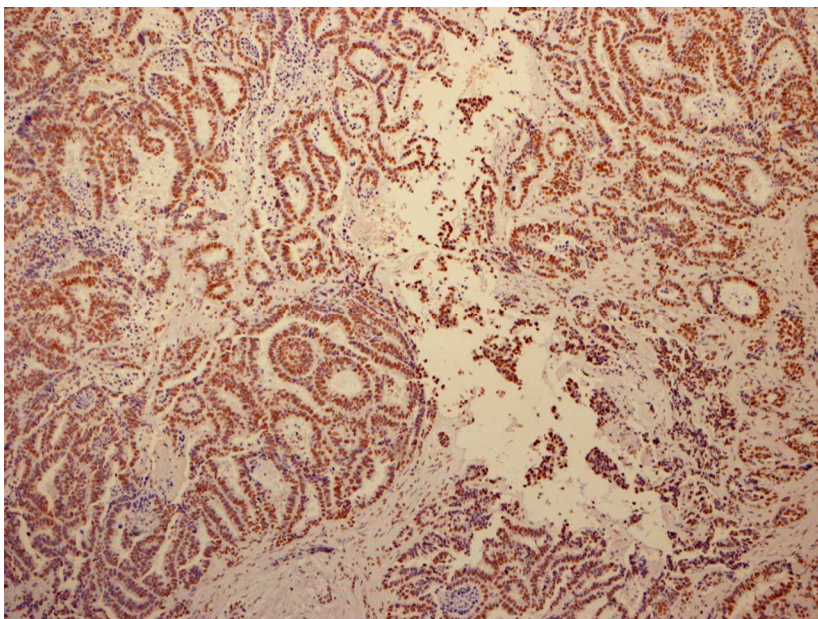
7.6. H3K9 intensidade fraca



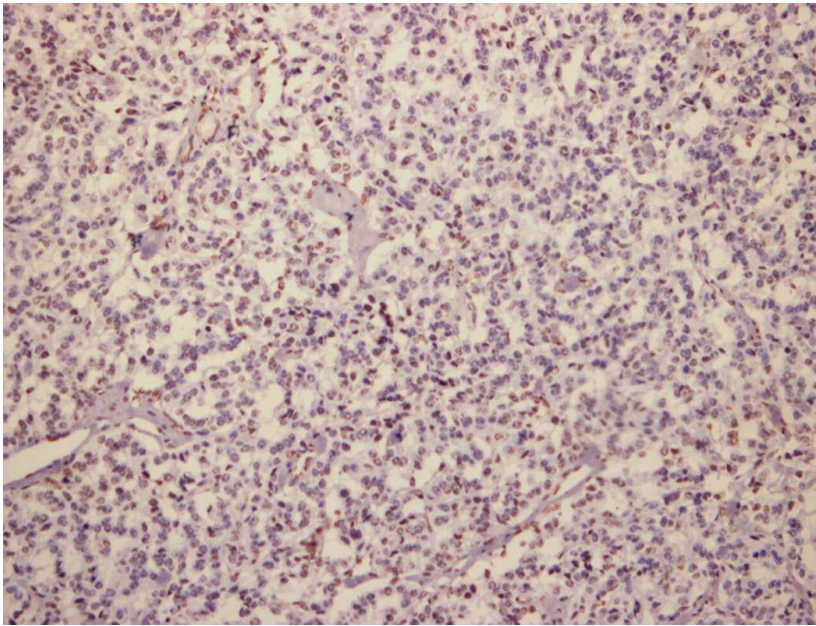
7.7. H3K9 metástase



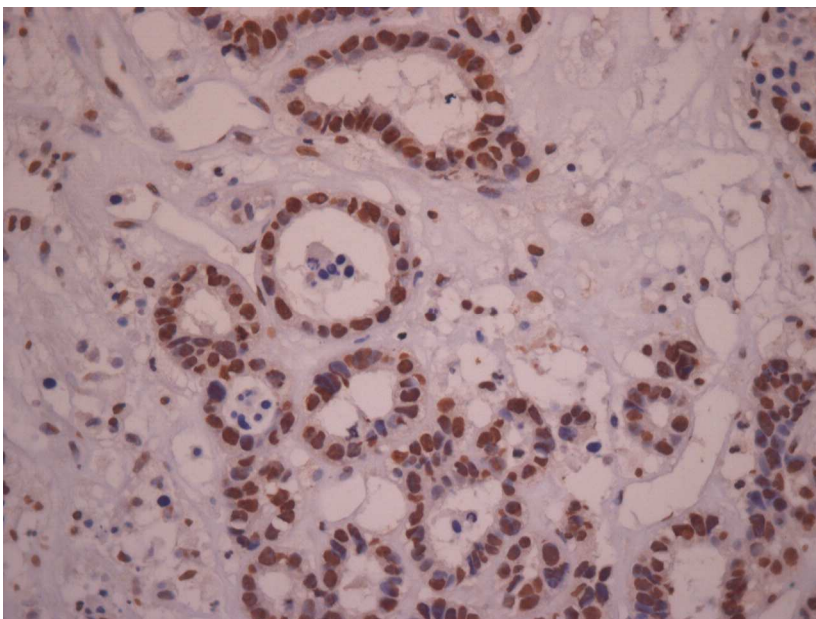
7.8. H3K18 expressão alta



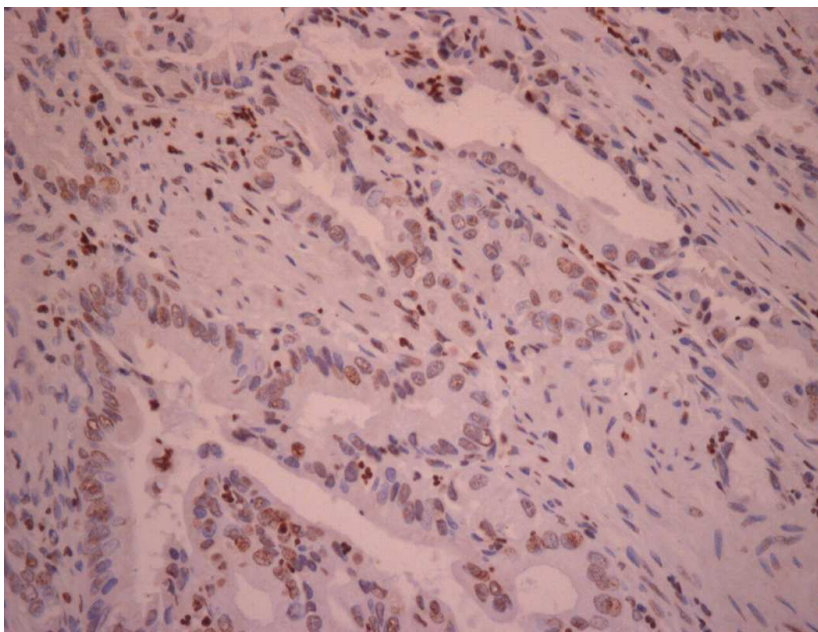
7.9. H3K18 expressão baixa



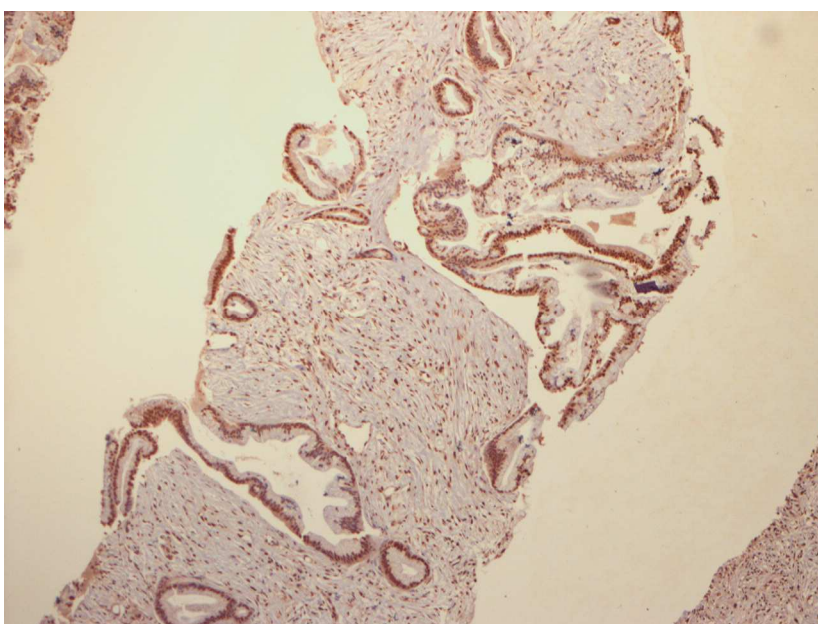
7.10. H3K18 intensidade forte



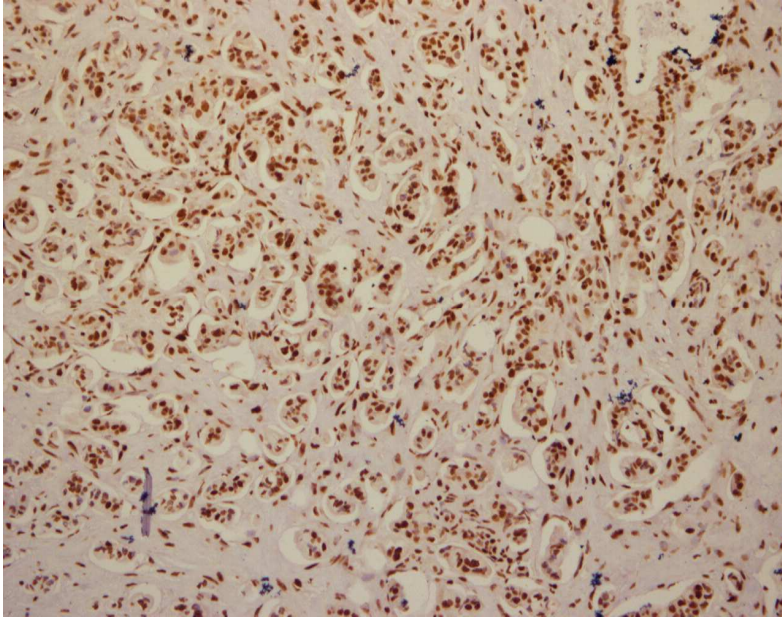
7.11. H3K18 intensidade fraca



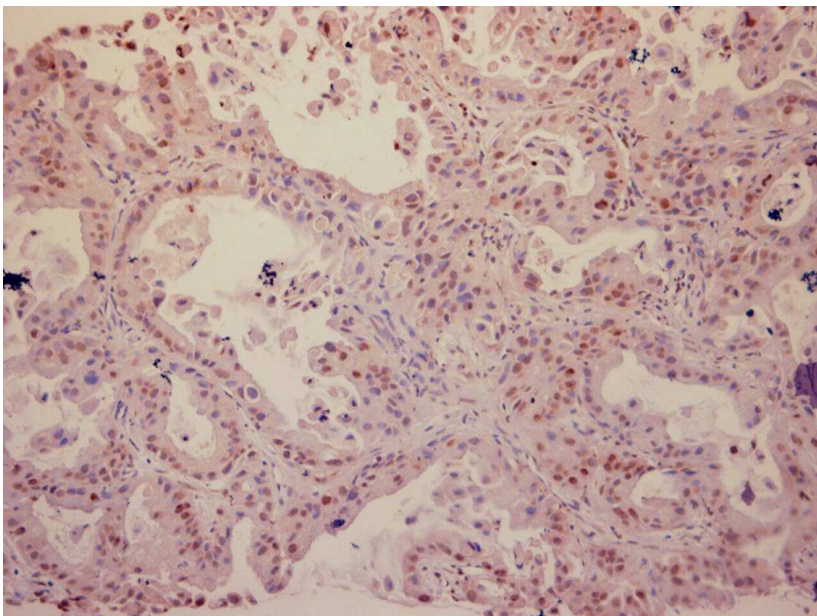
7.12. H3K18 metástase



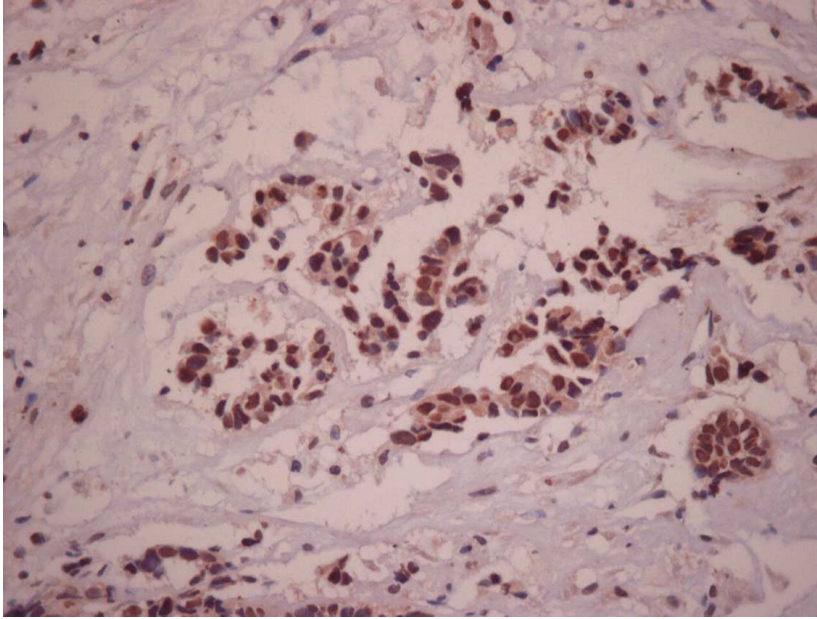
7.13. H4K12 expressão alta



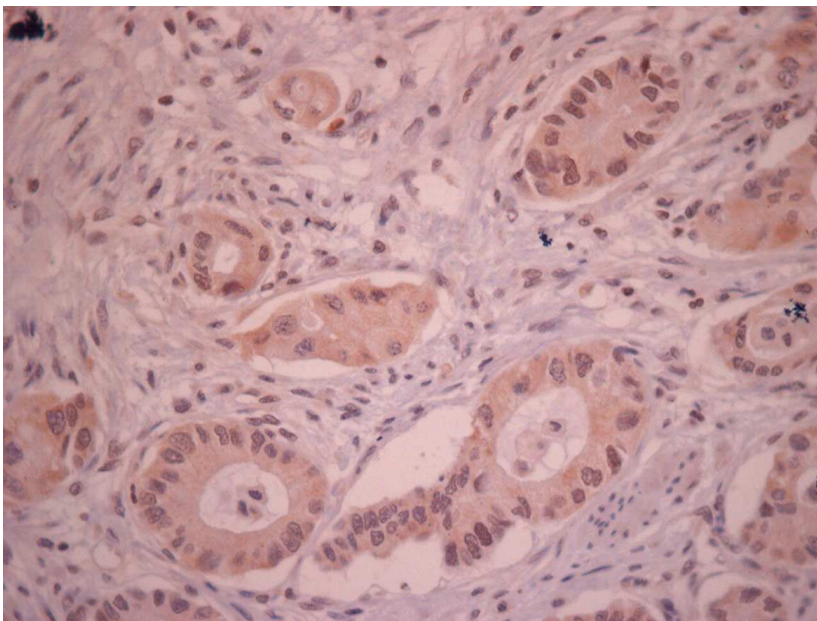
7.14. H4K12 expressão baixa



7.15. H4K12 intensidade forte



7.16. H4K12 intensidade fraca



7.17. H4K12 metástase

