

El Residente

REVISIÓN - OPINIÓN

Células troncales del cáncer como nuevas herramientas para combatir el adenocarcinoma de páncreas

Ana Karen Félix-Félix,* Damián Sánchez-Ramírez,* Eugenia Flores-Figueroa*

RESUMEN. El adenocarcinoma ductal de páncreas es una de las neoplasias más fatales, presentando una tasa de supervivencia del 5% a cinco años. En EUA se coloca dentro de la cuarta causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres. El pobre pronóstico se debe a una naturaleza silente de la enfermedad, asociada a un diagnóstico tardío, alto potencial metastásico y resistencia a quimioterapia y radioterapia convencionales. Las células troncales del cáncer son aquellas células dentro del tumor con la capacidad de autorrenovarse y producir estirpes heterogéneas de células tumorales, logrando el desarrollo y mantenimiento del tumor. En 2007, Li localizó en adenocarcinoma de páncreas una población con dichas características, identificándolas con los marcadores de superficie CD44, CD24 y EpCAM; éstas eran capaces de reproducir el tumor en xenotrasplante murino. Las terapias convencionales, incluyendo gemcitabina, no son capaces de afectar a la población de células troncales del cáncer, favoreciendo la resistencia y recurrencia del tumor. Actualmente se encuentran en estudio múltiples vías de señalización propias de tales células, como son Hedgehog y Notch, con la intención de establecer tratamientos dirigidos contra las células troncales del cáncer.

Palabras clave: Adenocarcinoma de páncreas, metástasis, gemcitabina, células troncales del cáncer, cáncer.

ABSTRACT. This review presents, from a basic perspective, the status of the knowledge of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and the relevance of this knowledge to generate new and better therapeutic strategies. PDAC is one of the most fatal cancers, with a survival rate of 5% at 5 years. In USA is placed within the fourth leading cause of cancer death in men and women. The poor prognosis is due to a silent nature of the disease, associated with a late diagnosis, high metastatic potential and resistance to conventional

ABREVIATURAS

ALDH-1: Aldehído deshidrogenasa uno.
 ABCB5: Gen perteneciente a la superfamilia de transportadores ABC. Transportador de membrana plasmática.
 CD: Clúster de diferenciación.
 CSC: Célula troncal del cáncer (Cancer stem cell, por sus siglas en inglés).

CXCR4: Receptor de quimiocina.
 EpCAM: Molécula de adhesión celular epitelial.
 NOD/SCID: Ratón no obeso con inmunodeficiencia severa combinada (por sus siglas en inglés, Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency).

* Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Unidad Médica de Alta Especialidad en Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Correspondencia:

Dra. Eugenia Flores Figueroa

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. UMAE Hospital de Oncología. IMSS, Siglo XXI.
 Avenida Cuauhtémoc No. 330. 4o piso. Colonia Doctores, CP. 06720, México, D.F.
 Tel: 56276900, ext. 22705, 22702
 E-mail: eflores.figueroa@gmail.com

Recibido: 21 de abril del 2014. Aceptado con modificaciones: 18 de agosto del 2014.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: www.medicgraphic.com/elresidente

chemotherapy and radiation. Cancer stem cells are those cells within the tumor, with the ability to self-renew and to produce a tumor on an animal model. In 2007, Li et al, reported for the first time, the presence of cancer stem cells in PDAC. Conventional therapies including gemcitabine, are not able to affect the population of cancer stem cells, favoring resistance and tumor recurrence. Therefore, there is a need to develop therapies against cancer stem cells.

Key words: Pancreatic adenocarcinoma, metastasis, gemcitabine, cancer stem cells, cancer.

ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

El adenocarcinoma ductal de páncreas representa el 90% de las neoplasias que se presentan en dicho órgano; actualmente se considera como una de las neoplasias más fatales, presentando una tasa de supervivencia del 5% a cinco años.¹ En EUA se coloca dentro de la cuarta causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres, y para el 2013 se estimaron 45,220 casos nuevos y 38,460 muertes por adenocarcinoma de páncreas.² En nuestro país, de 1980 al 2008, la mortalidad de cáncer de páncreas se ha triplicado, siendo el 0.5% de las defunciones generales, de acuerdo con el perfil epidemiológico de tumores malignos en México.

La única cura potencial es la resección quirúrgica; sin embargo, sólo el 20% de los pacientes son candidatos a la cirugía, mismos que suelen tener una tasa de supervivencia de 20% a cinco años, con una supervivencia media de 15 a 19 meses.² El pobre pronóstico se debe a una naturaleza silente de la enfermedad, asociada a un diagnóstico tardío, alto potencial metastásico y resistencia a quimioterapia y radioterapia convencionales; al diagnóstico, el 80% de los casos representan enfermedad avanzada, donde las terapias no suelen mejorar el pronóstico.²

CÉLULAS TRONCALES DEL CÁNCER

El modelo tradicional del origen del cáncer considera que las células que conforman un tumor son homogéneas y producto de la transformación de una célula normal que va adquiriendo alteraciones al azar (o estocásticas) que la llevan desde una proliferación exacerbada hasta

la migración y metástasis. Este modelo, conocido como modelo estocástico (*Figura 1*), considera que aquellos cambios o mutaciones que favorecen a la célula del cáncer se van manteniendo en su progenie. De acuerdo con este modelo, una vez que el tumor ha sido tratado con radiación o quimioterapia, todas las células del tumor deben responder de la misma forma; si las células fueron susceptibles, debe eliminarse todo el tumor y alcanzarse remisión.³

Uno de los modelos recientes para explicar el cáncer basa su origen en células troncales (modelo jerárquico) (*Figura 1*). En 1990, estudios del grupo del Dr. John Dick en leucemia mieloide aguda proporcionaron evidencia sobre la existencia de la heterogeneidad tumoral, utilizando un modelo de ratón en el que eran trasplantadas células humanas. Este modelo de xenotrasplante utiliza ratones inmunodeficientes, los cuales no rechazan las células humanas y permiten el crecimiento de los tumores (*Figura 2*). Estos autores encontraron que dentro de todas las células leucémicas, únicamente una muy pequeña subpoblación tenía la habilidad de reproducir la enfermedad y generar leucemia mieloide aguda humana en estos ratones. Esta subpoblación celular era poco frecuente y estaba compuesta por células que expresaban en su membrana los antígenos CD34 y CD38 (las cuales también estaban presentes en células troncales normales); estas células fueron denominadas células iniciadoras de la leucemia (*Figura 1*).^{4,5} En el modelo jerárquico se considera que la respuesta a la radioterapia o quimioterapia es diferente de acuerdo con el tipo celular, siendo las células troncales del cáncer, generalmente, resistentes al tratamiento y responsables de las recaídas.

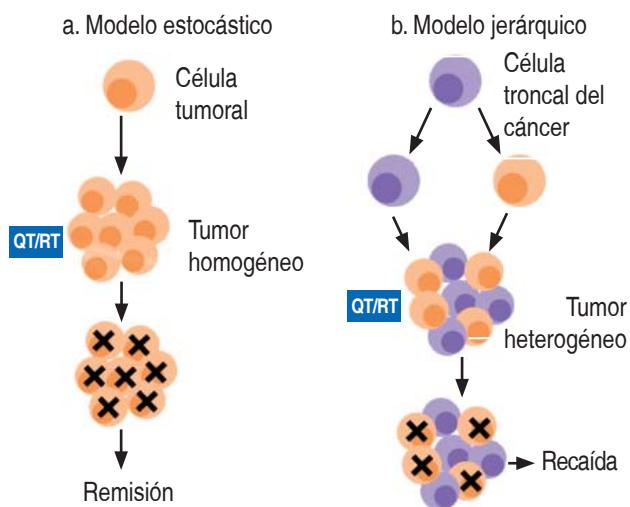


Figura 1. Modelo de la carcinogénesis. Inicialmente se creía que estaba basado en el modelo estocástico, donde una misma célula era capaz de generar el tumor, con las mismas características y misma sensibilidad a las terapias convencionales. Sin embargo, desde la descripción de las células troncales del cáncer (CSC) se estableció el modelo jerárquico, donde una CSC es capaz de sufrir división simétrica para generar otra CSC o asimétrica, originando una célula diferenciada. Este modelo, además, se relaciona con la presencia de recaída, debido a la resistencia de las CSC a las terapias y su capacidad de mantener el tumor.

Las células troncales del cáncer fueron aisladas por primera vez en 2003 de tumores sólidos por el Dr. Al-Hajj en tumores de mama (humanos), utilizando el modelo de xenotrasplante en ratón.⁶ Estos autores encontraron que únicamente una fracción de células del tumor de mama eran capaces de iniciar dicha neoplasia; estas células fueron identificadas por la expresión de CD44 y bajos niveles de CD24, siendo negativas a marcadores de linaje (o de células maduras), y las denominaron células iniciadoras del tumor.⁶ En el caso de tumores cerebrales, se identificaron como células que expresan CD133, capaces de generar el tumor en modelo de xenotrasplante.⁷ Las células troncales del cáncer se han reportado en un número creciente de neoplasias utilizando diferentes marcadores (*Cuadro I*).

Las células troncales del cáncer (CSC, por sus siglas en inglés, *cancer stem cells*) fueron nombradas por la Asociación Americana para el Estudio del Cáncer (*American Association for Cancer Research*), definiéndolas como aquella célula dentro del tumor que posee la capacidad de autorrenovarse (producir células con el mismo potencial y jerarquía al dividirse) y producir estirpes heterogéneas de células cancerígenas que conforman el tumor.⁸

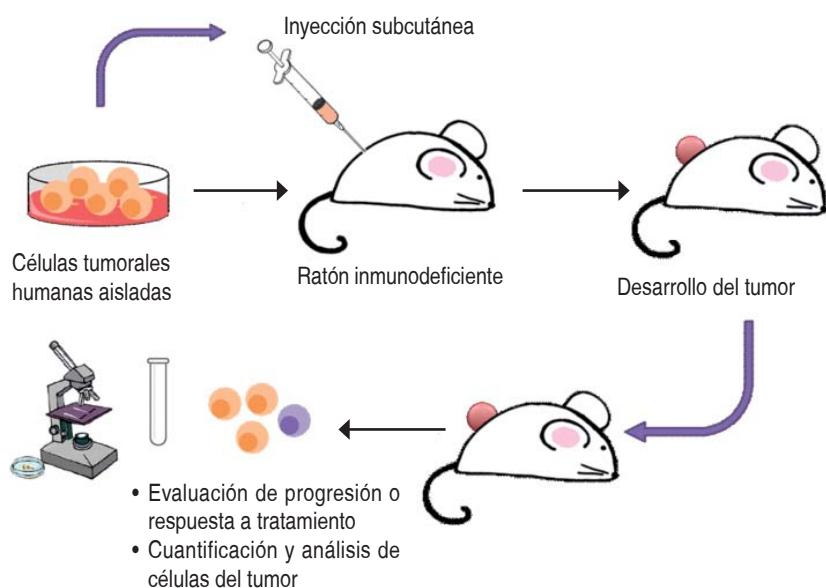


Figura 2.

Modelo de xenotrasplante en el ratón. Xenotrasplante es el trasplante de células vivas, tejidos u órganos provenientes de una especie a otra. En el caso de las neoplasias, se aíslan y cultivan las células de interés del tumor humano, para posteriormente implantarlas en un ratón inmunodeficiente (principalmente NOD/SCID, BALC/C y sus derivados). Se deja desarrollar al tumor, y una vez presente, se evalúan las características del mismo y de las células presentes en él. También se puede administrar alguna terapia durante el desarrollo para evaluar la respuesta a la misma.

Cuadro I. Marcadores de CSC identificados en diversos tumores sólidos. ⁸	
Tipo de neoplasia	Marcador de superficie celular
Pulmón	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺
Cárcinoma hepático	CD90 ⁺ , CD45 ⁺ , CD44 ⁺
Ovario	CD44 ⁺ , CD117 ⁺
Colon	CD133 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD44 ⁺ , CD166 ⁺ , ALDH1 ⁺
Páncreas	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD133 ⁺
Melanoma	ABCB5 ⁺
Sarcoma Ewing	CD133 ⁺
Glioma	CD133 ⁺
Sarcoma	CD105 ⁺ , CD44 ⁺ , Stro1 ⁺
Mama	CD44 ⁺ , CD24 ^{/low}
Próstata	CD133 ⁺ , CD44 ⁺
Cárcinoma escamoso de cabeza y cuello	CD44 ⁺

Dentro de las características de las CSC se ha observado que suelen encontrarse en estado quiescente o en fase G0, son multipotentes y resistentes a la apoptosis,⁹ cuentan con la expresión de moléculas de adhesión, capacidad de migración y adaptación, además de contar con un incremento en la expresión de transportadores de resistencia a fármacos y de sistemas de reparación de DNA, dejando como consecuencia la resistencia a la quimioterapia y radioterapia, favoreciendo la recaída, así como un alto potencial metastásico.^{10,11}

Además, se ha observado que cuando se presenta recurrencia, las células tumorales muestran un fenotipo quimiorresistente, característica asociada a las CSC. Actualmente las terapias convencionales están dirigidas contra las células en proliferación y se requiere un ciclo celular activo para inducir apoptosis, por lo que la naturaleza quiescente de las CSC también permite su resistencia a las terapias convencionales.¹²

CÉLULAS TRONCALES DEL CÁNCER EN ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

La primera evidencia de la existencia de las CSC en adenocarcinoma de páncreas fue repor-

tado por Li y colaboradores en el 2007; en este trabajo identificaron en un modelo murino de xenotrasplante una población altamente tumoral, la cual era positiva a los marcadores CD44, CD24 y EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial). Esta subpoblación celular mostró características que son propias de células troncales, incluyendo la capacidad de autorrenovarse, de diferenciarse y restablecer el tumor,¹⁰ así como expresaron moléculas características del desarrollo embrionario.¹³⁻¹⁵

En el 2007 Hermann y su equipo reportaron que la expresión de CD133 en células obtenidas de cáncer pancreático humano posee capacidad de autorrenovación, formación de esferas y tumores *in vivo*.¹⁶ El grupo de Hermann reportó en páncreas dos poblaciones: la primera, positiva para el marcador CD133, la cual es responsable de iniciar y mantener el tumor primario, y la segunda, una población conformada por CSC que además de expresar CD133 expresaba CXCR4 (un receptor de quimiocina), que se une específicamente al factor derivado del estroma (SDF-1), las cuales tuvieron un mayor potencial metastásico. CXCR4 y SDF-1 son clave en el mantenimiento y supervivencia de los ductos pancreáticos, así como en la proliferación y migración durante la organogénesis y regeneración del páncreas. En este estudio se reportó que las células provenientes del tumor perdían la capacidad de producir metástasis cuando CXCR4 era neutralizado.¹⁶ Además, encontraron un número significativo de los marcadores CD133 y CXCR4 en tumores primarios de pacientes con metástasis a nódulos linfáticos, demostrando una correlación clínica entre CSC con capacidad migratoria y la enfermedad en estado avanzado.¹⁶

Wang y colaboradores reportaron en el 2012 en una línea de adenocarcinoma de páncreas (PANC-1) la expresión de los marcadores de células troncales del cáncer CD133, CD44, OCT4 y nestina, en una fracción de células provenientes de cultivos no adherentes que, además, tenían como característica la formación de esferas. En este estudio se menciona que esta población –llamada «Panc-1 Stem like»– posee

una tasa baja de proliferación, resistencia a la quimioterapia, evasión de la vía apoptótica a través de genes llamados de resistencia a multidrogas (MDR-1), además de un potencial elevado de tumorigénesis *in vivo*.¹⁷

En adenocarcinoma de páncreas, se han reportado diferentes marcadores celulares (CD133, CD24, EpCAM, nestina, entre otros) que distinguen células con características de CSC; sin embargo, se desconoce si estos marcadores se encuentran presentes en una misma CSC o son distintas subpoblaciones, por lo que es necesario realizar estudios en donde se utilicen todos estos marcadores y se defina si están presentes en la misma célula o existe jerarquía dentro de las propias CSC.

TERAPIAS BLANCO CONTRA LAS CÉLULAS TRONCALES EN CÁNCER DE PÁNCREAS

Las estrategias terapéuticas actuales para tratar el adenocarcinoma de páncreas incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, cuidados paliativos, entre otros. De acuerdo con el estado del paciente, se somete a cirugía si el tumor es resecable (cuando es detectado de forma temprana), lo cual quiere decir que el tumor no se ha propagado aún hacia otros órganos, particularmente a vasos sanguíneos mayores. En la cirugía se emplea el procedimiento de Whipple, pancreatectomía distal o total, de acuerdo a la ubicación del tumor (donde un mínimo de 12 a 15 ganglios linfáticos son resecados); sin embargo, pese a que el tumor haya sido completamente resecado, la enfermedad es recurrente. Se ha establecido el papel del tratamiento postoperatorio en los pacientes que fueron tratados por cirugía; los resultados reportados por el «Grupo Europeo de Estudio para Cáncer Pancreático Prueba 1» mostraron que la administración postoperatoria con base en la quimioterapia mediante fluoracino, leucovorina o gemcitabina mejora la supervivencia global.

El «Grupo de Oncología de Terapia por Radiación» mostró que la combinación con gemcitabina y fluoracilo tratados con radiación

resultó en una tendencia incrementada de la supervivencia global, aunque este resultado no fue significativo; pese a ello, la supervivencia en estos pacientes presentó una mediana de 20 a 22 meses. La supervivencia reportada en pacientes con progresión del tumor avanzada que reciben tratamiento se reduce de 9 a 10 meses. El tamaño grande del tumor, los ganglios linfáticos, el grado de diferenciación, el efecto de los márgenes de resección positivos son factores de riesgo para la enfermedad recurrente (revisado en Hidalgo).¹⁸

El reto en el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas se encuentra no solamente en el estado avanzado en el que es diagnosticado, sino también a que es un tumor agresivo, por lo que estudiar su biología puede llevar al desarrollo de mejores estrategias para tratarlo. Es necesario desarrollar estrategias para eliminar a las CSC, las cuales son resistentes al tratamiento y responsables de las recaídas.¹⁶ Es por ello que en este campo se ha enfocado un particular interés sobre las CSC y terapias dirigidas hacia dicha población celular.¹⁹

Para eliminar a las CSC pueden seguirse varias estrategias; una de ellas se basa en la eliminación de estas células utilizando las moléculas que expresan en su superficie. La desventaja de esta estrategia es que las CSC no expresan antígenos exclusivos, sino que expresan antígenos o proteínas que se encuentran en otros tipos celulares y en células troncales normales. Otra de las estrategias es eliminar a estas células bloqueando vías de señalización importantes para su supervivencia, las cuales se encuentran únicamente encendidas durante el desarrollo embrionario, lo cual está siendo explorado en adenocarcinoma de páncreas.²⁰ Estas vías de señalización regulan funciones celulares como metabolismo, movimiento, proliferación, diferenciación, muerte y supervivencia.^{21,22} Hedgehog es una proteína que se expresa normalmente en el desarrollo embrionario y se sobreexpresa en tumores (estómago, vía biliar y páncreas).²³ La señalización de Hedgehog se activa a través de la unión de un receptor de membrana (PtC); esta interacción ligando-

ceptor inhibe la función de Ptc, reprimiendo a smo, otro receptor de membrana correspondiente a la vía, lo que conduce a la activación de genes implicados en ella, como Ptc-1.²⁴

TERAPIAS COMBINADAS PARA EL TRATAMIENTO DEL ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

Debido a que las células tumorales y las CSC tienen alteradas diferentes vías de señalización, es necesario utilizar terapias combinadas que tengan como blanco dos o varias de estas vías.

Hedgehog se encuentra sobreexpresado en el 70% de casos de adenocarcinoma de páncreas,¹⁵ y su activación anormal está ligada a la sobreexpresión del oncogén K-Ras,^{25,26} por lo que se reconoce que la vía de Hedgehog participa en el desarrollo, mantenimiento y progresión del tumor.^{27,28} Sin embargo, la inhibición de Hedgehog no es suficiente para erradicar a las CSC, y no funciona como sustituto de la gemcitabina; esto puede deberse a que la vía de señalización Hedgehog no actúa por sí sola, sino que hay una relación sinérgica con otras vías implicadas en el desarrollo del cáncer en páncreas.²⁹

Mueller y colaboradores probaron en modelos *in vitro* e *in vivo* que la combinación de ciclopamida, rapamicina y gemcitabina eliminaba completamente el tumor. Esta terapia combinada tiene como blanco la vía de Hedgehog (ciclopamida), la vía de mTOR (rapamicina), el cual pertenece a la familia de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) y regula el crecimiento y la proliferación celular,^{30,31} y gemcitabina, que no ha demostrado tener efecto sobre CSC, pero sí en células tumorales.²⁹ Existen otras rutas, como la vía de señalización de Notch, que se ha visto implicada en el desarrollo del adenocarcinoma de páncreas,^{32,33} la cual puede ser también un blanco terapéutico.

EL FUTURO DEL TRATAMIENTO DEL ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

El futuro del tratamiento del cáncer de páncreas deberá considerar la heterogeneidad tumoral y desarrollar estrategias para reducir el tamaño del tumor para ofrecer una posibilidad quirúrgica al 80% de los pacientes que se diagnostican en estadios tardíos. Para ello, es necesario conocer las vías de señalización que utilizan las células tumorales y las CSC para sobrevivir, proliferar y migrar. Entre más información se genere, tendremos más probabilidades de cambiar la supervivencia actual de los pacientes con adenocarcinoma de páncreas. Esta investigación debe surgir desde los consultorios, de la observación de los pacientes y el conocimiento de la literatura, así como de los laboratorios de investigación, para que al conjuntar esfuerzos se conozcan futuros blancos terapéuticos, así como compuestos que inhiban dichos blancos. Un ejemplo es la curcumina, un compuesto de origen natural que tiene efecto inhibitorio sobre la proliferación de células de adenocarcinoma de páncreas e induce la apoptosis de las células neoplásicas a través de la inhibición de la vía de señalización de Notch.³⁴

El conocimiento generado en los últimos años con respecto a los procesos que conllevan al cáncer ha permitido visualizar un área más amplia y una perspectiva sólida para el desarrollo de nuevas líneas de investigación que se enfoquen a las células troncales del cáncer y sus mecanismos de regulación, por lo que es importante estudiar su biología, conocer su comportamiento *in vitro* e *in vivo*, así como los mecanismos que regulan las características de tronalidad en el proceso tumorigénico, lo cual les confiere la resistencia a la quimioterapia y radioterapia; esto con el fin de desarrollar nuevos tratamientos específicamente dirigidos hacia dicha población en el adenocarcinoma de páncreas y otras neoplasias.³⁵

BIBLIOGRAFÍA

1. Herreros-Villanueva M, Gironella M, Castells A, Bujanda L. Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2013; 418: 22-29.
2. Tempero MA et al. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2012: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2012; 10: 703-713.
3. Idikio HA. Human cancer classification: a systems biology-based model integrating morphology, cancer stem cells, proteomics, and genomics. *J Cancer.* 2011; 2: 107-115.
4. Balic A, Dorado J, Alonso-Gómez M, Heeschen C. Stem cells as the root of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Cell Res.* 2012; 318: 691-704.
5. Lapidot T et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994; 367: 645-648.
6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernández A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 3983-3988.
7. Galli R et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 7011-7021.
8. Clarke MF et al. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006; 66: 9339-9344.
9. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009; 217: 144-160.
10. Jiang W, Peng J, Zhang Y, Cho WCS, Jin K. The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 16636-16657.
11. Li C et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 1030-1037.
12. Li L, Cole J, Margolin DA. Cancer stem cell and stromal microenvironment. *Ochsner J.* 2013; 13: 109-118.
13. Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene.* 1999; 18: 7844-7851.
14. Wicking C, McGlinn E. The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2001; 173: 1-7.
15. Thayer SP et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature.* 2003; 425: 851-856.
16. Hermann PC et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 313-323.
17. Wang D et al. CD133(+)/CD44(+)/Oct4(+)/Nestin(+) stem-like cells isolated from Panc-1 cell line may contribute to multi-resistance and metastasis of pancreatic cancer. *Acta Histochem.* 2013; 115: 349-356.
18. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2010; 362: 1605-1617.
19. Lonardo E, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic cancer stem cells - update and future perspectives. *Mol Oncol.* 2010; 4: 431-442.
20. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 2001; 15: 3059-3087.
21. Boticario CB, Angosto MC. Innovaciones en cáncer. Editorial UNED; 2009.
22. Curtis H, Barnes NS, Schnek A. Biología. Ed. Médica Panamericana; 2008.
23. Berman DM et al. Widespread requirement for hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature.* 2003; 425: 846-851.
24. Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Dev Camb Engl.* 2000; 127: 4905-4913.
25. Taipale J et al. Effects of oncogenic mutations in smoothened and patched can be reversed by cyclopamine. *Nature.* 2000; 406: 1005-1009.
26. Dimou A, Syrigos K, Saif MW. Rationale for inhibition of the hedgehog pathway paracrine loop in pancreatic adenocarcinoma. *JOP J Pancreas.* 2011; 12: 1-5.
27. Dosch JS, Pasca di Magliano M, Simeone DM. Pancreatic cancer and hedgehog pathway signaling: new insights. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol IAP Al.* 2010; 10: 151-157.
28. Gould A, Missailidis S. Targeting the hedgehog pathway: the development of cyclopamine and the development of anti-cancer drugs targeting the hedgehog pathway. *Mini Rev Med Chem.* 2011; 11: 200-213.
29. Mueller MT et al. Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2009; 137: 1102-1113.
30. Perugini RA, McDade TP, Vittimberga FJ Jr, Callery MP. Pancreatic cancer cell proliferation is phosphatidylinositol 3-kinase dependent. *J Surg Res.* 2000; 90: 39-44.
31. Ng SSW, Tsao MS, ChowS, Hedley DW. Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 5451-5455.
32. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999; 284: 770-776.
33. Song SY et al. Expansion of Pdx1-expressing pancreatic epithelium and islet neogenesis in transgenic mice over-expressing transforming growth factor alpha. *Gastroenterology.* 1999; 117: 1416-1426.
34. Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH. Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer.* 2006; 106: 2503-2513.
35. Dorado J, Lonardo E, Miranda-Lorenzo I, Heeschen C. Pancreatic cancer stem cells: new insights and perspectives. *J Gastroenterol.* 2011; 46: 966-973.