ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA - PCPC17

GALECTINA-9 (GAL-9) ESTÁ PRESENTE NO SORO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PÂNCREAS, MAS NÃO NO SOBRENADANTE DE LINHAGENS TUMORAIS PANCREÁTICAS.L. B. TAVARES^{1,2}, A. F. S. FILHO^{1,2}, K. M. VILAR^{1,2}, M. R. MARTINS⁴, M. G. R. PITTA^{1,2,3}, I. R. PITTA³ e M. J. B. M. RÊGO^{1,2,3}¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica.³ Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT)⁴ Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP)

E-mail para contato: lucas.batista_tavares@hotmail.com

RESUMO – O câncer de pâncreas está associado a um prognóstico ruim, diagnóstico tardio, e apresenta resistência aos tratamentos disponíveis atualmente. Galectinas participam de uma série de vias celulares que podem contribuir para o comportamento das células tumorais. Galectina-9 (Gal-9) atua na regulação da apoptose, interação celular, processo de invasão e angiogênese. Este estudo teve por objetivo avaliar os níveis de Gal-9 presentes no soro de pacientes acometidos pelo câncer de pâncreas e nos sobrenadantes de linhagens celulares representantes desta neoplasia. Estes foram mensurados por ELISA sanduíche. Todos os 29 pacientes com câncer de pâncreas apresentaram positividade para níveis séricos de Gal-9 (mediana = 7462), sendo observado nesses indivíduos um aumento significativo ($p < 0,0001$) nos valores dessa proteína circulante quando comparados a controles saudáveis (mediana = 46,88). Já os níveis de Gal-9 presentes em sobrenadantes de linhagens tumorais pancreáticas Mia PaCa-2 e PANC-1 ficaram abaixo do limite de detecção ($< 46,875$ pg/ml.). Pacientes com câncer de pâncreas apresentam níveis séricos de Gal-9 alterados.

Palavras-chave: Glicobiologia. β -galactosídeos. Inovação Terapêutica.

ABSTRACT – Pancreatic cancer is associated with a bad prognosis, late diagnosis, and resistance to available treatments. Galectins participate in various cell pathways that may contribute to the behavior of tumor cells. Galectin-9 (Gal-9) acts in the apoptosis regulation, cell interaction, invasion and angiogenesis processes. This study aimed to evaluate the expression of Gal-9 in pancreatic cancer. Serum levels of Gal-9 in pancreatic tumor patients and pancreatic tumor cells lines supernatants exposed to hypoxia and nutritional were measured by sandwich ELISA. All 29 pancreatic cancer patients presented positive serum levels of Gal-9, with a significant increase ($p < 0,0001$) of this circulating protein when compared to healthy individuals. However, Gal-9 levels in supernatants of pancreatic tumor cells exposed to hypoxia and nutritional deprivation conditions for 24 and 48 hours were below the limit of detection ($< 46,875$ pg/ml, $R_2 = 0,8388$). Patients with pancreatic cancer have altered serum levels of Gal-9.

Keywords: Glycobiology. β -galactoside. Therapeutic Innovation.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pâncreas é a quarta principal causa de morte por câncer em países desenvolvidos, apresentando em cerca de 7% dos casos uma taxa de sobrevivência geral de 5 anos (XU et al., 2014). Devido à dificuldade na identificação do tumor em estágios mais precoces, o câncer de pâncreas apresenta com frequência um prognóstico ruim, tendo possibilidade de ser realizada a ressecção cirúrgica em somente 15-20% dos casos (CID-ARREGUI; JUAREZ, 2015). Entre as neoplasias malignas que acometem o pâncreas, 80-90% são representadas pelo tipo adenocarcinoma ductal pancreático, que por sua vez, é caracterizado pela intensa reação desmoplásica, com presença de fibroblastos, células inflamatórias e excessiva massa fibrótica, além do aumento significativo do fluido intersticial (WOLFGANG et al., 2013). Além disso, outra característica fundamental nesses tumores, é a presença de regiões hipóxicas que, assim como ocorre na maioria dos tumores sólidos, há uma diminuição dos níveis de oxigênio, que contribui para maior agressividade da doença (CÁRDENAS-RODRÍGUEZ et al., 2012). Isto acontece pela capacidade do microambiente desmoplásico e hipóxico de favorecerem a expressão de diversas proteínas com funções essenciais para o desenvolvimento e a sobrevivência do tumor (LIU, Y.; DU, L., 2015).

Galectinas são proteínas da família das lectinas, com afinidade por β -galactosídeos, e estão envolvidas em diversas funções no desenvolvimento do câncer (KIM et al., 2013). A Galectina-9 (Gal-9) é uma glicoproteína que apresenta dois domínios de reconhecimento de carboidratos (LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A., 2005). A mesma pode apresentar uma variedade de atividades biológicas no contexto tumoral: exercendo um papel regulador do ciclo celular e apoptose, contribuindo para a adesão, migração e metástase, além da fuga da resposta imunológica e influência na angiogênese (HEUSSCHEN, R.; GRIFFIOEN, A. W.; THIJSSEN, V. L., 2013).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 RECRUTAMENTO DE PACIENTES – Foram incluídos 29 pacientes de ambos os sexos com idade entre 40 e 70 anos comprovadamente diagnosticado com câncer de pâncreas que estavam sendo acompanhados pelo setor de oncologia do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e ainda não tinham sido submetidos a nenhum tipo de tratamento. Estes, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) se submeteram a coleta de sangue periférico através de punção venosa. Um grupo controle pareado por sexo e faixa etária, sendo formado por voluntários saudáveis sem diagnóstico de CP e sem histórico de CP familiar também foi incluído no estudo. O projeto possui aprovação pelo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE: 44002815.2.1001.5205).

2.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS – Os tubos de coleta contendo cerca de 9 mL de sangue foram centrifugados nas condições de 2.500 rpm/10 minutos, os soros depositados em eppendorfs e posteriormente armazenados em freezer – 80 °C.

2.3 CULTIVO CELULAR – Duas linhagens celulares de carcinoma de pâncreas foram utilizadas nesse estudo. A célula MIA PaCa-2 foi mantida em cultura com meio DEMEM *high glucose* (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 2,5% de soro equino (Cultilab). A linhagem PANC-1 foi cultivada em meio DEMEM suplementado com 10% de SFB, HEPES 10 mM (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico), bicarbonato de sódio 24 mM, penicilina e estreptomicina 200 U/mL em estufa de atmosfera úmida a 37° C, com 5% de CO₂.

2.4 DOSAGEM DE GALECTINA-9 – Níveis de galectina-9 presentes no soro de pacientes com câncer de pâncreas e no sobrenadante das linhagens Mia PaCa-2 e PANC-1, foram quantificados por ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) sanduíche, seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores (R&D Systems). As avaliações foram feitas em duplicata, com limite de detecção do kit entre 46,8 pg/ml – 6000 pg/ml.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados dois grupos de amostras compostos por voluntários saudáveis (n=65), e os casos de câncer de pâncreas (n=29) pareados por sexo (p=0,1130) e idade (p=0,1205). A mediana de idade dos voluntários sadios e doentes foi 63 e 66 anos, respectivamente. Os pacientes controles apresentavam 81% e os casos de câncer de pâncreas 65% de indivíduos do sexo feminino. Todos os soros de pacientes com câncer de pâncreas foram positivos para Gal-9 (mediana =7462). Sendo observado um aumento significativo (p<0,0001) em relação aos controles saudáveis (mediana=46.88) (Figura 1).

Figura 1 – Níveis séricos de Gal-9 no soro de voluntários saudáveis e diagnosticados com câncer de pâncreas. (****= p<0,0001). Fonte: próprio autor, 2017.

Os níveis de Gal-9 em sobrenadantes de células expostas ficaram abaixo do limite de detecção do kit (<46,875 pg/ml. R²=0,8388). Galectina-9 tem sua expressão alterada em uma variedade de tipos tumorais, incluindo cânceres que afetam o trato gastrointestinal. Viu-se que nos tumores gástrico, adenocarcinoma esofágico e metástases hepáticas provenientes do câncer de pâncreas, essa proteína desempenha papel primordial para supressão do crescimento celular, apoptose e regulação da progressão tumoral (TADOKORO et al., 2017; AKASHI et al., 2017; CHOI et al., 2017 Por isso, acredita-se que as células tumorais podem desempenhar mecanismos adaptativos capazes de inibir a expressão dessa proteína, como observado em tumores hematopoiéticos em associação com outros tipos de galectina (DEMERSA et al., 2009).

4. CONCLUSÃO

No presente estudo foi observado que pacientes acometidos pelo câncer de pâncreas apresentam níveis séricos da galectina-9 elevados em relação aos controles saudáveis. No entanto, as linhagens celulares avaliadas não representam um bom modelo de avaliação de Gal-9.

5. REFERÊNCIAS

- AKASHI, E.; FUJIHARA, S.; MORISHITA, A.; TADOKORO, T.; CHIYO, T.; FUJIKAWA, K.; KOBARA, H.; MORI, H.; IWAMA, H.; OKANO, K.; SUZUKI, Y.; NIKI, T.; HIRASHIMA, M.; MASAKI, T. Effects of galectin-9 on apoptosis, cell cycle and autophagy in human esophageal adenocarcinoma cells. **Oncol Rep.** 2017 Jul;38(1):506-514.
- CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, J.; Li, Y.; GALONS, J. P.; CORNNELL, H.; GILLIES, R. J.; PAGEL, M. D.; BAKER, A. F.; Imaging biomarkers to monitor response to the hypoxia-activated prodrug TH-302 in the MiaPaCa2 flank xenograft model. **Magnetic Resonance Imaging**, 1002–1009. 2012.
- CHOI, S. I.; SEO, K. W.; KOOK, M. C.; KIM, C. G.; KIM, Y. W.; CHO, S. J. Prognostic value of tumoral expression of galectin-9 in gastric cancer. **Turk J Gastroenterol.** 2017 May;28(3):166-170.
- CID-ARREGUI, A.; JUAREZ, V.; Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. **World J Gastroenterol**, 21(31): 9297-9316. 2015.
- DEMERSA, M.; COUILLARDA, J.; GIGLIA-MARIC, G.; MAGNALDOB, T.; ST-PIERRE, Y. Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, V. 387, 3:(25)425–429. 2009.
- HEUSSCHEN, R.; GRIFFIOEN, A. W.; THIJSEN, V. L.; Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades. **Biochim Biophys Acta** 1836: 177-185, 2013.
- IKEMORI, R. Y.; MACHADO, C. M. L.; FURUZAWA, K. M.; NONOGAKI, S.; Osinaga, E.;
- UMEZAWA, K.; CARVALHO, M. A.; VERINAUD, L.; CHAMMAS, R.; Galectin-3 Up-Regulation in Hypoxic and Nutrient Deprived Microenvironments Promotes Cell Survival. **PLOS one**, 2014.
- KIM, S. J.; HWANG, J. A.; RO, J. Y.; LEE, Y. S.; CHUN, K. H.; Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer. **Oncotarget**, Vol.4, No 9. 2013.
- LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A.; Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**. v. 5 2005.
- LIU, Y.; DU, L.; Role of pancreatic stellate cells and periostin in pancreatic cancer progression. **Tumor Biol**, 36:3171–3177. 2015.
- TADOKORO, T.; FUJIHARA, S.; CHIYO, T.; OURA, L.; SAMUKAWA, E.; YAMANA, Y.; FUJITA, K. Induction of apoptosis by Galectin-9 in liver metastatic cancer cells: In vitro study. **Int J Oncol.** 2017 Aug;51(2):607-614.
- WOLFGANG, C. L.; HERMAN, J. M.; LAHERU, D. A.; KLEIN, A. P.; ERDEK, M. A.; FISHMAN, E. K.; HRUBAN, R. H.; Recent Progress in Pancreatic Cancer. **CA Cancer J Clin**, 63(5): 318–348. 2013.
- XU, Z.; POTHULA, S. P.; WILSON, J. S.; APTE, M. V.; Pancreatic cancer and its stroma: A conspiracy theory. **World journal of gastroenterology**, 28; 20(32): 11216-11229. 2014.

6. AGRADECIMENTOS

Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if).