



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LUCAS BATISTA TAVARES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS GALECTINAS-7 E -9 NO
ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS**

Recife

2018

LUCAS BATISTA TAVARES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS GALECTINAS-7 E -9 NO
ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Tavares, Lucas Batista

Avaliação da expressão das Galectinas-7 e -9 no adenocarcinoma de pâncreas / Lucas Batista Tavares - 2018.

54 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice.

1. Pâncreas - Câncer 2. Glicobiologia 3. Lectina

I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (Orientador) II. Título

616.99437 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-208

LUCAS BATISTA TAVARES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS GALECTINAS-7 E -9 NO
ADENOCARCINOMA DE PÂNCREAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 23/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Marcela Silvestre Outtes Wanderley (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco

Profa. Dra. Marianne de Vasconcelos Carvalho (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco

RESUMO

O câncer de pâncreas consiste na quarta principal causa de morte por câncer em países desenvolvidos. Esta neoplasia está associada a um prognóstico pobre, diagnóstico tardio, e apresenta resistência aos tratamentos disponíveis atualmente. Galectinas são proteínas que apresentam afinidade por carboidratos do tipo β -galactosídeos e participam de uma série de vias celulares que podem contribuir para o comportamento das células tumorais. Galectina-7 (Gal-7) apresenta expressão alterada em muitos tipos de câncer e possui atividade controversa, dependendo do tecido em que está localizada. Galectina-9 (Gal-9) modula uma variedade de funções biológicas, incluindo apoptose, agregação e adesão de células tumorais. Este estudo teve por objetivo avaliar a expressão das Gal-7 e -9 no adenocarcinoma de pâncreas. Foi avaliada a expressão de Gal-7 e -9 em tecidos de tumores pancreáticos por Imunohistoquímica. Os níveis da Gal-7 e Gal-9 no soro de pacientes acometidos pelo câncer de pâncreas foram mensurados por ELISA. A localização celular da Gal-7 foi investigada por imunofluorescência em duas linhagens de câncer de pâncreas (Mia PaCa-2 e PANC-1). A expressão proteica de Gal-7 foi avaliada por Western Blotting. Foi realizado o ensaio de intervenção, adicionando Gal-7 recombinante (rhGal-7) no meio de cultivo, para avaliar a capacidade migratória e expressão de marcadores de apoptose, proliferação, autofagia, estresse de retículo endoplasmático e transição epitélio/mesenquimal. Foi observada marcação positiva para Gal-7 em 8/16 amostras de tecido de tumores pancreáticos, exibindo uma marcação pontual e heterogênea nas células tumorais, e marcação positiva em células endoteliais, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Gal-9 foi positiva em 15/16 amostras de tecido com marcação citoplasmática homogênea. Apenas 18 de 32 pacientes com câncer de pâncreas apresentaram positividade para níveis séricos da Gal-7, sendo observado nesses pacientes um aumento significativo ($p < 0,0001$) nos valores dessa proteína circulante quando comparados aos controles. Os níveis da Gal-7 em sobrenadantes de linhagens tumorais pancreáticas ficaram abaixo do limite de detecção ($< 78,125$ pg/ml). Os níveis séricos de Gal-9 foram positivos em 100% dos casos de câncer de pâncreas ($p < 0,0001$). A avaliação da localização celular da Gal-7 foi negativa para as duas linhagens. A avaliação da expressão de Gal-7 por Western Blotting, mostrou que ambas as linhagens não apresentam expressão dessa proteína. O ensaio de intervenção com a rhGal-7 recombinante mostrou que a Gal-7 é capaz de aumentar o marcador de proliferação e reduzir os marcadores de autofagia e estresse do retículo endoplasmático em PANC-1 e elevar a expressão do marcador de proliferação, apoptose e autofagia em MiaPaCa-2. **Palavras-chave:** Glicobiologia. Câncer. Lectina.

ABSTRACT

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer death in developed countries. This neoplasm is associated with poor prognosis, late diagnosis, and resistance to currently available treatments. Galectins are proteins that exhibit affinity for β -galactoside-type carbohydrates and participate in several cell pathways that may contribute to the behavior of tumor cells. Galectin-7 (Gal-7) has altered expression in many types of cancer and has controversial activity depending on the tissue in which it is located. Galectin-9 (Gal-9) modulates a variety of biological functions, including apoptosis, aggregation, and adhesion of tumor cells. This study aimed to evaluate the expression of Gal-7 and -9 in pancreatic adenocarcinoma. The expression of Gal-7 and -9 in pancreatic tumor tissues was evaluated by Immunohistochemistry. Gal-7 and Gal-9 levels in the serum of patients with pancreatic cancer were measured by sandwich ELISA. The cell location of Gal-7 was investigated by immunofluorescence in two pancreatic cancer strains (Mia PaCa-2 and PANC-1). Protein expression of Gal-7 was assessed by Western blotting. Finally, the interventional assay was performed by adding recombinant Gal-7 (rhGal-7) in the culture medium so that the migratory capacity and expression of markers of apoptosis, proliferation, autophagy, endoplasmic reticulum stress and epithelial transition / mesenchymal. Positive labeling for Gal-7 was observed in 8/16 tissue samples from pancreatic tumors, exhibiting punctual and heterogeneous labeling on tumor cells, and positive labeling on endothelial cells, inflammatory cells and blood vessels. Gal-9 was positive in 15/16 tissue samples with homogeneous cytoplasmic labeling. Only 18 of 32 patients with pancreatic cancer presented a positive result for serum levels of Gal-7, with a significant increase ($p < 0.0001$) in these circulating protein values when compared to healthy controls. Gal-7 levels present in supernatants of pancreatic tumor lines were below the limit of detection ($< 78,125$ pg / ml). Serum levels of Gal-9 were positive in 100% of pancreatic cancer cases ($p < 0.0001$). The evaluation of the cell location of Gal-7 was negative for both strains. Evaluation of Gal-7 expression by Western Blotting, showed that both lines do not show expression of this protein. The intervention assay with recombinant rhGal-7 showed that Gal-7 can enhance the proliferation marker and reducing the autophagy and endoplasmic reticulum stress markers in PANC-1 and elevating expression of the proliferation, apoptosis, and autophagy marker in MiaPaCa-2.

Keywords: Glycobiology. Cancer. Lectin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 OBJETIVOS.....	10
1.1.1 Objetivo geral.....	10
1.1.2 Objetivos específicos.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 CÂNCER DE PÂNCREAS.....	11
2.1.1 Epidemiologia.....	11
2.1.2 Etiologia.....	11
2.1.3 Fisiopatologia.....	13
2.1.4 Tratamento.....	17
2.2 GALECTINAS.....	18
2.2.1 Galectina-7.....	22
2.2.2 Galectina-9.....	23
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	25
3.1 AMOSTRAS DE TECIDO E RECRUTAMENTO DE PACIENTES.....	25
3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	25
3.3 DOSAGEM DE GALECTINA (ELISA).....	25
3.4 CULTIVO CELULAR.....	26
3.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	26
3.6 WESTERN BLOTTING.....	26
3.7 ENSAIO DE INTERVENÇÃO (GALECTINA-7 RECOMBINANTE)	27
3.8 ANÁLISE DE MORTE E CICLO CELULAR (CITOMETRIA DE FLUXO....	27
3.9 ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	27
3.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	27
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 RESULTADOS	29

4.1 GALECTIN-7 CHARACTERIZATION IN HUMAN SERUM, TISSUE AND CELL MODELS OF PANCREATIC ADENOCARCINOMA.....	29
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA PANCREAS: JOURNAL OF NEUROENDOCRINE TUMORS AND PANCREATIC DISEASES AND SCIENCES.....	51

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pâncreas é a quarta principal causa de morte por câncer em países desenvolvidos, apresentando uma taxa de sobrevivência geral de 5 anos em apenas 2-3% dos casos (XU et al., 2014). Os fatores de risco associados ao desenvolvimento deste tipo de câncer são, entre outros, o tabagismo, pancreatites crônicas, diabetes mellitus tipo II e obesidade, além da idade e raça, sendo mais comum em homens negros acima dos 60 anos, tendo pouca influência de fatores hereditários (TEMPERO et al., 2010).

Os desafios no diagnóstico do câncer de pâncreas estão relacionados principalmente à localização retroperitoneal do órgão, além dos sintomas inespecíficos associados, impossibilitando a identificação do tumor antes de alcançar um estágio clínico avançado (ROSSI; REHMAN; GONDI, 2014). Devido à dificuldade no diagnóstico do tumor em estágios mais precoces, o câncer de pâncreas apresenta com frequência um prognóstico pobre, tendo possibilidade de ser realizada a ressecção cirúrgica em somente 15-20% dos casos (CID-ARREGUI; JUAREZ, 2015).

Estudos recentes indicam novos tratamentos promissores para esse tipo de câncer, como por exemplo o FOLFIRINOX ou Gencitabina associada ao Nab-paclitaxel (RUBINSON; WOLPIN, 2015), porém a monoterapia com Gencitabina continua sendo a estratégia terapêutica de primeira-linha utilizada para a doença (DUONG et al., 2014).

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). Atualmente, as características do câncer de pâncreas são atribuídas ao estroma pancreático e à hipóxia intratumoral, uma vez que o microambiente desmoplásico e hipóxico favorecem a expressão de diversas proteínas com funções essenciais para o desenvolvimento e a sobrevivência do tumor (LIU; DU, 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). Até o presente momento, foram descritos 16 tipos diferentes nesta

família, as quais foram denominadas de acordo com a ordem de descobrimento (Gal-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15 e -16) (IKEMORI et al., 2014).

Galectina-7 (Gal-7) é uma proteína monomérica, descrita inicialmente como um marcador de estratificação epitelial, envolvida na manutenção da epiderme humana normal (SAUSSEZA; KISSB, 2006). Atualmente, sabe-se que sua expressão em células tumorais é consideravelmente alterada, uma vez que a transcrição de Gal-7 é induzida pelo gene supressor tumoral de p53, que está envolvido com a regulação da apoptose, e é o gene mais comumente alterado na biologia do câncer (CAMPION et al., 2013). Porém, a função desta glicoproteína no desenvolvimento do câncer é controversa, variando de acordo com o órgão e podendo desempenhar um papel anti ou pró-apoptótico (LABRIE, 2014).

Galectina-9 (Gal-9) é uma galectina tipo tandem-repeat, com dois domínios de reconhecimento de carboidratos. Estudos revelam que o Gal-9 modula uma variedade de funções biológicas, incluindo apoptose, agregação e adesão de células tumorais. A associação de Gal-9 em processos de progressão tumoral é baseada nos relatos de que a sua expressão alterada tem valor diagnóstico ou prognóstico em diferentes tipos de câncer (THIJSSSEN et al., 2015).

O presente estudo visa a identificação e a compreensão de novos biomarcadores para o câncer de pâncreas. Apesar da baixa incidência, o câncer de pâncreas representa o tipo neoplásico cuja a taxa de mortalidade mais cresce no mundo. Enquanto pacientes acometidos por outras neoplasias, como o câncer de mama, colorretal e próstata apresentam, respectivamente, uma taxa de sobrevida geral de 5 anos em 90%, 67% e 100% dos casos, no câncer de pâncreas esse valor é inferior a 5%. O câncer de pâncreas é reconhecido pela falta de sintomas específicos, rápida progressão e morte. Esse prognóstico pobre está diretamente relacionado ao atraso na identificação do tumor. Apesar da existência de vários marcadores séricos para o diagnóstico do câncer de pâncreas, estes apresentam baixa sensibilidade e especificidade, e a presença de outras patologias podem induzir casos de falsos positivos e negativos. Então, o estabelecimento de marcadores que auxiliem a identificação do tumor em estágios precoces é o fator mais importante para aumentar o prognóstico da doença.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão da Galectina-7 e Galectina-9 em amostras de pacientes com câncer de pâncreas e em modelos celulares.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão das galectina-7 e -9 tecidual em amostras de câncer de pâncreas;
- Analisar os níveis das galectina-7 e -9 nos soros de pacientes com câncer de pâncreas;
- Investigar a expressão da galectina-7 em modelos celulares de câncer de pâncreas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE PÂNCREAS

2.1.1 Epidemiologia

O câncer é uma das principais causas de morbidade em todo o mundo e a segunda maior causa de mortalidade, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018). Essa neoplasia, que constitui um conjunto de mais de 100 doenças, foi responsável por cerca de 8.8 milhões de óbitos em 2015, e espera-se que 9,8 milhões de novos casos sejam diagnosticados nos próximos vinte anos (GLOBOCAM, 2016). No Brasil, estima-se que sejam identificados 600 mil novos casos até o final de 2018, sendo os tipos mais frequentes os cânceres de próstata (68 mil) e de mama em mulheres (59 mil) (INCA, 2018).

Em 2012, o câncer de pâncreas representou 4% do total de mortes por câncer no mundo (STEWART; WILD, 2014). Este, que é reconhecido pelo caráter silencioso devido à falta de sintomas específicos, é diagnosticado, em média, aos 71 anos de idade. O câncer de pâncreas é representado pelo tipo adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, do inglês *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*), que corresponde a 90% de todos os casos identificados e apresenta uma taxa de sobrevivência geral de 5 anos em menos de 5% dos casos. Estimou-se, que em 2016 fossem diagnosticados cerca de 53 mil novos casos em todo o mundo (XU, 2014; MILLER, 2016).

2.1.2 Etiologia

Estudos populacionais estabelecem que ambos, fatores ambientais e genéticos, contribuem para o desenvolvimento do PDAC (TEMPERO et al., 2010). O tabagismo é o fator de risco mais comum associado ao desenvolvimento da doença. Esta, é a causa de pelo menos 25% de todos os tumores pancreáticos. Análises de dados têm mostrado que fumantes apresentam duas vezes mais susceptibilidade ao acometimento do câncer pâncreas comparados a indivíduos que nunca fumaram (BOSETTI et al., 2012; BARONE et al., 2016).

Outros fatores de risco incluem, o aumento do índice de massa corporal (IMC >35), a ingestão excessiva de álcool, o consumo elevado de carne vermelha e laticínios, e a exposição ocupacional a determinados produtos químicos como a beta-naftilamina e benzidina (WELEDJI et al. 2016). Indivíduos com histórico de pancreatites crônicas,

como diabetes mellitus tipo II, apresentam o dobro de chance de serem acometidos pelo câncer de pâncreas (DUELL; LUCENTEFORTE; OLSON, 2012).

Além dos fatores de risco ambientais, alterações genéticas hereditárias podem ser importantes para o desenvolvimento dos tumores de pâncreas. O câncer de pâncreas familiar, em que a presença da doença em parentes de primeiro grau aumenta o risco do desenvolvimento, é raro, contudo, a predisposição genética está presente em até 7-10% dos casos (DEL CHIARO et al., 2014).

Mutações germinativas no gene de *CDKN2A* (*p16*) têm sido relatadas em famílias diagnosticadas com câncer de pâncreas e em casos de melanoma. Muitos casos de carcinoma pancreático têm sido identificados em famílias que apresentam mutações em *BRCA2* (gene de susceptibilidade ao câncer de mama 2). Além disso, foi relatado que alterações em *PALB2* podem estar relacionadas à susceptibilidade ao câncer de pâncreas (Tabela 1) (GHIORZO; GARGIULO; NASTI, 2007; FERRONE; LEVINE; TANG, 2009; SLATER; LANGER; NIEMCZYK, 2010).

Tabela 1 – Fatores de risco associados ao câncer de pâncreas.

Fator de Risco	Estimativa de risco
Pancreatites (>2 anos)	2.71
Tabagismo	2.20
Diabetes mellitus	1.8 a 2.1
Consumo anterior de tabaco	
1-10 anos sem fumar	1.64
15-20 anos sem fumar	1.12
IMC (>35 vs 18.9-24.9)	1.55
Consumo excessivo de álcool	1.46
Grupo de Risco	Estimativa de Risco
Câncer de pâncreas familiar	
3 ou mais parentes de primeiro grau com câncer de pâncreas	32
Gene	Risco Relativo
PALB2	Elevado
STK11 (Síndrome de Peutz-Jeghers)	132
PRSS1 (Pancreatite Hereditária)	58

CDKN2A (Melanoma familiar)	38
HNPCC (Síndrome de Lynch)	8.6
BRCA2	3.51
BRCA1	2.26

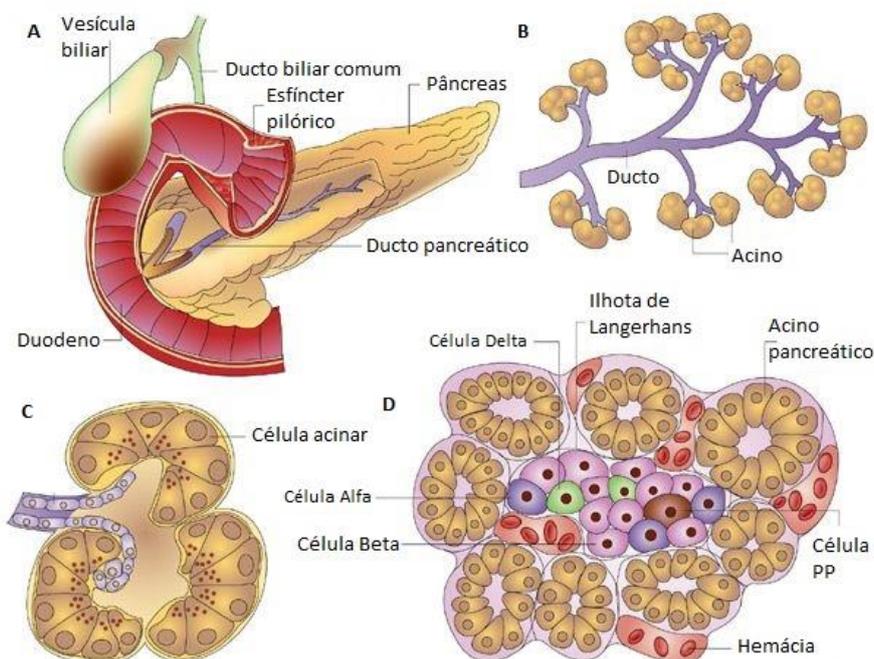
Fonte: modificado de DEL CHIARO et al. (2014); WELEDJI et al. (2016); WOLFGANG et al. (2013).

2.1.3 Fisiopatologia

O pâncreas está localizado numa região retroperitoneal e mantém seu suporte sanguíneo independente dos outros órgãos abdominais. O tecido pancreático compreende dois compartimentos com funções distintas, o pâncreas endócrino e exócrino. O primeiro, localizado dentro do parênquima, é responsável pelo metabolismo energético, e é composto pelas células α -, β -, δ -, γ -, e células PP que secretam, respectivamente, os hormônios glucagon, insulina, somatostatina, grelina e o polipeptídeo pancreático. Por outro lado, o pâncreas exócrino compõe 90% do órgão, é composto por células acinares e centroacinares ligadas por uma elaborada rede ducto-epitelial e está relacionado com o processo de digestão de carboidratos, gorduras e proteínas (Figura 1) (RHIM; STANGER, 2010).

Intercaladamente ao parênquima pancreático, se encontra o tecido estromal composto principalmente por células endoteliais e fibroblastos quiescentes, representando menos de 1% de todo o pâncreas saudável. Além de desempenharem funções estruturais de manutenção do tecido, as células do estroma, principalmente os fibroblastos especializados, denominados de células estreladas do pâncreas (PSCs, do inglês *pancreatic stellate cells*), atuam no armazenamento de vitamina A, regulação do sistema imune e vigilância e manutenção do volume de células endoteliais (ALGUL et al., 2007; MASAMUNE et al., 2009).

Figura 1 – Ilustração representativa do pâncreas. A: anatomia do pâncreas, **B:** Subunidades do pâncreas, **C:** histologia do pâncreas e **D:** células do compartimento endócrino e exócrino do pâncreas.



Fonte: <https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/736x/39/13/0b/39130bd247e29ea0d62654f3c50467f3.jpg>; Modificada. Acessado em: 19 de abril de 2017.

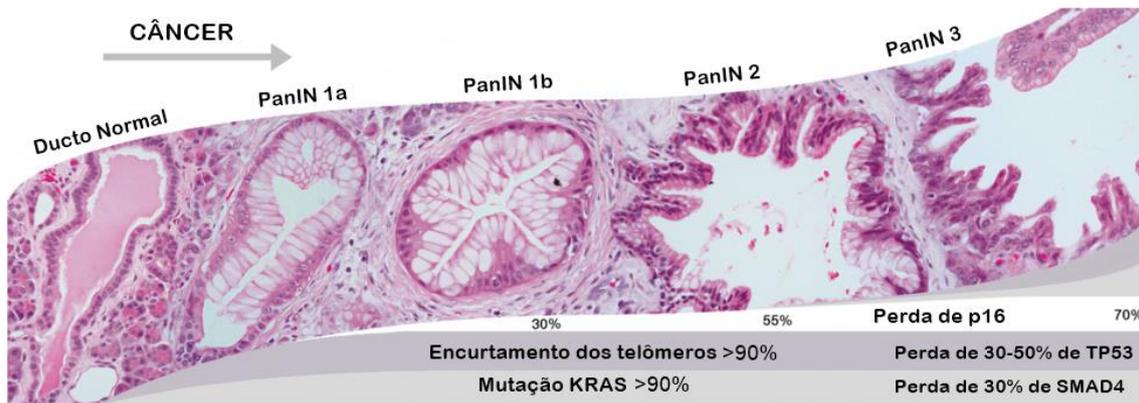
Apesar de raro, o compartimento endócrino do pâncreas pode ser acometido por alguns tipos de carcinoma. No entanto, o pâncreas exócrino é o principal tecido afetado pelo PDAC (APTE et al., 2013; LI et al., 2016; NEESSE et al., 2015; WHATCOTT et al., 2013).

O PDAC evolui a partir de lesões precursoras bem definidas que estabelecem o padrão genético da carcinogênese pancreática (HRUBAN; MAITRA; GOGGINS, 2008). Histologicamente, a doença se manifesta como vários tipos distintos de lesões precursoras, sendo as mais comuns a neoplasia intraepitelial pancreática microscópica (PanIN), seguida dos cistos macroscópicos, denominados de neoplasia papilar intraductal mucinosa (IPMN) e a neoplasia cística mucinosa (MCN) (KAMISAWA et al., 2016).

As lesões não invasivas PanIN são normalmente classificadas em três estágios de evolução da lesão, de acordo com a extensão citológica e arquitetura atípica: PanIN1A (lesão lisa), PanIN1B (tipo micropapilar), PanIN2 e PanIN3. PanIN1A e 1B mostram baixo grau de displasia, ou seja, ausência de atipia nuclear e polaridade nuclear retida. PanIN2 exibe perda da polaridade celular, aglomeração nuclear, alargamento celular e hiperchromasia com frequente formação papilar. E PanIN3 são lesões avançadas, também

conhecidas como carcinoma *in situ*, apresentam perda generalizada de polaridade, mitoses frequentes com grave atipia nuclear e necrose luminal (Figura 2) (KOORSTRA et al., 2008; VINCENT et al., 2011).

Figura 2 – Diferentes estágios das neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanINs). O modelo de progressão de PanIN mostra que o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas impulsiona a progressão neoplásica nessas lesões precursoras de displasia de baixo grau (PanIN 1 e PanIN 2) para displasia de alto grau (PanIN 3) para eventualmente um adenocarcinoma pancreático invasivo.



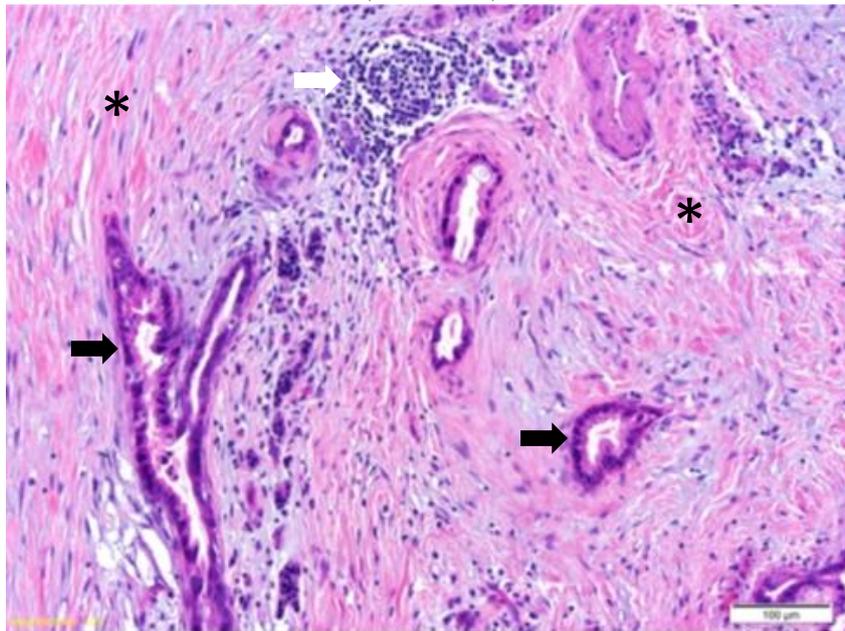
Fonte: modificado de HACKENG et al. (2016).

A mutação pontual do oncogene KRAS (do inglês *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) é observada em quase todas as lesões precursoras do câncer pancreático e em PDACs. As mutações subsequentes que dirigem a progressão neoplásica nas lesões de PanIN estão normalmente nos genes supressores tumorais CDKN2A, TP53 e SMAD4 (WADDELL et al., 2015; BIANKIN et al., 2012; JONES et al., 2008.). O acúmulo adicional de alterações genéticas e epigenéticas impulsiona a progressão neoplásica nestas lesões precursoras, conduzindo eventualmente a um adenocarcinoma pancreático invasivo. Os genes menos frequentemente mutados em PDAC incluem MLL3, TGFBR2, ATM, ARID1A, ROBO2 e KDM6A. As mutações nos genes reguladores da cromatina (MLL, MLL2, MLL3 e ARID1A) têm sido associadas com uma melhor sobrevida e a perda de SMAD4 com menor sobrevivência (WITKIEWICZ et al., 2015; SAUSEN et al., 2012; BLACKFORD et al., 2009).

Uma variedade de tumores distintos clinicamente e patologicamente podem acometer o pâncreas, podendo ser classificados entre sólidos e císticos. Essas definições, juntamente com a aparência radiológica do tumor podem ser úteis para o estreitamento do diagnóstico clínico, além de ter importantes implicações na administração e prognóstico do paciente. Entre todos os tumores que acometem o pâncreas, o

adenocarcinoma ductal invasivo (PDAC) é o mais comum, e como sugere sua denominação, este apresenta padrões glandulares de crescimento e infiltra outros tecidos com muita facilidade. Esse tipo de neoplasia, tem uma consistência sólida e firme, apresentando extensões de células neoplásicas para além do tecido principal (Figura 3) (MINI et al., 2006; SEICEAN; PETRUSEL; SEICEAN, 2015).

Figura 3 – Histopatologia de um adenocarcinoma ductal invasivo (PDAC). Presença de glândulas atípicas (setas pretas) embebidas pelo estroma desmoplásico (asteriscos pretos), característico desse tumor. Presença de infiltrado de células inflamatórias (seta branca).



Fonte: HRUBAN; PITMAN; KLIMSTRA (2007).

O PDAC, comumente, alcança nervos e se espalha por todo espaço perineural, além de invadir facilmente vasos linfáticos, atingindo linfonodos regionais e pequenos vasos sanguíneos, formando metástase no fígado, de modo que quando diagnosticado, o tumor já se apresenta difundido para além do órgão, tornando-se ineleável para o procedimento de ressecção cirúrgica (MAFTOUH et al., 2014).

Outra característica histológica fundamental do PDAC, é a presença de uma intensa reação desmoplásica do tumor, que representa o acúmulo excessivo de tecido fibroso, formado por uma complexa matriz extracelular, e um infiltrado celular composto por fibroblastos, células inflamatórias, células endoteliais e está associado com significativo aumento da pressão do fluido intersticial dentro do tumor (HRUBAN; PITMAN; KLIMSTRA, 2007). Frequentemente, o estroma desmoplásico representa aproximadamente 80-90% da massa tumoral, no qual a concentração de colágeno do

tecido chega a ser três vezes maior do que o observado no pâncreas normal (LIU, Y.; DU, L., 2015).

As células estreladas do pâncreas são os principais componentes estromais que contribuem para o desenvolvimento da fibrose no PDAC (FERDEK; JAKUBOWSKA, 2017). Essas células podem ser encontradas tanto no pâncreas, quanto no fígado e rins, e possuem diferenças de acordo com o tecido de origem, no entanto, a principal característica das PSCs é a capacidade de armazenar retinóides, como vitamina A e seus análogos, em vesículas distribuídas no citosol (ZHAO; BURT, 2007).

Quando estão quiescentes no tecido, essas células possuem uma capacidade limitada de proliferação e migração. No entanto, quando ativadas as PSCs perdem suas vesículas com retinóides, elevam a expressão de alfa-actina de músculo liso com concomitante transformação morfológica para miofibroblastos, e adquirem intensa capacidade migratória e proliferativa (FRIEDMAN, 2008; ERKAN et al., 2012).

A ativação dessas células ocorre por meio de processos inflamatórios e carcinogênese, ocasionando em uma excessiva deposição de fibras colágenas no tecido tumoral. Estas, regulam ainda a atividade da Matriz Metaloproteinase-2 (MMP-2), a fim de promover a metástase pelas células malignas e demonstram alta capacidade migratória para formar novas colônias em metástases já estabelecidas (XU et al., 2010; SCHNEIDERHAN et al., 2007; VONLAUFEN et al., 2008).

As PSCs se relacionam com as células do câncer por meio de mecanismos de retroalimentação, liberando mutualmente fatores de crescimento que estimulam a proliferação, metástase e angiogênese nas células cancerígenas, e que por sua vez influenciam a síntese da matriz extracelular pelas células estreladas (KLEGER; PERKHOFER; SEUFFERLEIN, 2014). A complexa interação entre as células do câncer e PSCs leva a perpetuação da reação desmoplásica, cujo microambiente cada vez mais rico em fibras de colágeno, rodeiam firmemente as células malignas, restringindo o fluxo sanguíneo nas regiões internas do tumor, de modo a limitar a disponibilidade de oxigênio e nutriente, bem como a infiltração de células inflamatórias e o alcance de agentes terapêuticos (FEIG et al., 2012; SHIELDS et al., 2012).

2.1.4 Tratamento

Devido à falta de sintomas específicos, o PDAC apresenta dificuldades no diagnóstico, sendo realizado tardiamente, quando o tumor alcança estágios clínicos extremamente avançados, com presença de metástase (CAPURSO et al., 2015). Portanto, somente 15-20% dos casos apresentam potencial curativo, incluindo os casos passíveis

de ressecção cirúrgica do tumor, que mesmo após o procedimento cirúrgico somado a terapia adjuvante, não demonstram aumento da sobrevida geral de forma significativa (JEMAL et al., 2010; HABERLAND et al., 2010).

A elevada pressão do fluido intersticial tem sido associada com o aumento da dificuldade na perfusão do tumor. O que explica a baixa visualização no diagnóstico por contraste de imagem, e a baixa difusão dos agentes terapêuticos no câncer de pâncreas (AZMI et al., 2010).

A presença da reação desmoplásica do tumor no câncer de pâncreas deve ser levada em consideração na determinação da estratégia terapêutica utilizada no paciente, uma vez que mesmo os melhores agentes não serão eficazes se não alcançarem as células neoplásicas (RANGANATHAN; RANGNEKAR, 2005).

A hipóxia presente nesse tipo de tumor, também está relacionada a maior resistência ao tratamento e a um pior prognóstico clínico, pois a radiação ionizante e alguns quimioterápicos causam a ionização da água intracelular para produzir radicais livres que danificam o DNA, no entanto, a falta de oxigênio reduz diretamente esse efeito das drogas e da radioterapia (BRISTOW; HILL, 2008).

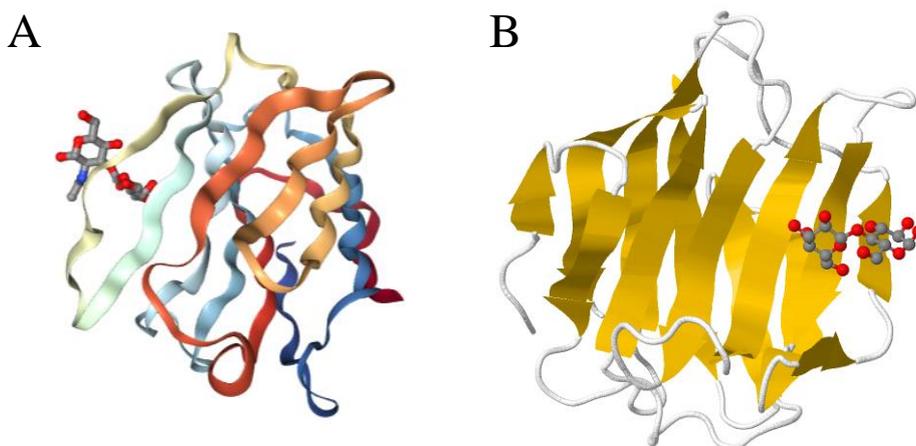
Ao passo que várias estratégias terapêuticas falharam em aumentar a taxa de sobrevivência geral dos pacientes, a gencitabina (2-2'-difluoro-desoxicitidina, Gemzar®), um análogo de citosina que atua inibindo a síntese do DNA nas células tumorais, continua sendo a terapia padrão de primeira linha para o câncer de pâncreas, mesmo demonstrando pouca eficácia ao tratamento, aumentando a sobrevida dos pacientes em apenas 9 meses (DUONG et al., 2014; KOSMIDIS et al., 2016). Além desta monoterapia, o FOLFIRINOX (ácido folínico, 5-fluorouracila, irinotecano, oxaliplatina) e a gencitabina combinada ao Nab-paclitaxel são novas opções terapêuticas promissoras para o PDAC avançado (RUBINSON; WOLPIN, 2015). Apesar do FOLFIRINOX apresentar maior eficácia no tratamento em relação a gencitabina, essa estratégia terapêutica tem mostrado alta toxicidade, dificultando seu uso em pacientes com PADC (ROMBOUTS et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

2.2 GALECTINAS

As galectinas compreendem grande parte da família das lectinas e são conhecidas, principalmente, por apresentarem alta afinidade por carboidratos do tipo β -galactosídeo e possuírem uma estrutura evolutivamente conservada, denominada de domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD). (MENDEZ-HUERGO; BLIDNER; RABINOVICH, 2017).

O CRD de uma galectina é formado por duas β -folhas antiparalelas que formam uma estrutura conhecida como β -sanduíche, capaz de dar suporte aos ligantes desta proteína (Figura 5). Dentro do CRD existem cerca de 130 aminoácidos altamente conservados que são essenciais para a ligação com carboidratos. No entanto, os CRDs de várias galectinas diferem em resíduos de aminoácidos que estão fora da sequência conservada, de modo que, diferentes galectinas reconhecem preferencialmente diferentes tipos de ligantes (KALTNER et al., 2017; GUPTA, 2012).

Figura 5 - Estrutura da galectina-7 (A) e galectina-9 (B) em complexo com carboidrato.



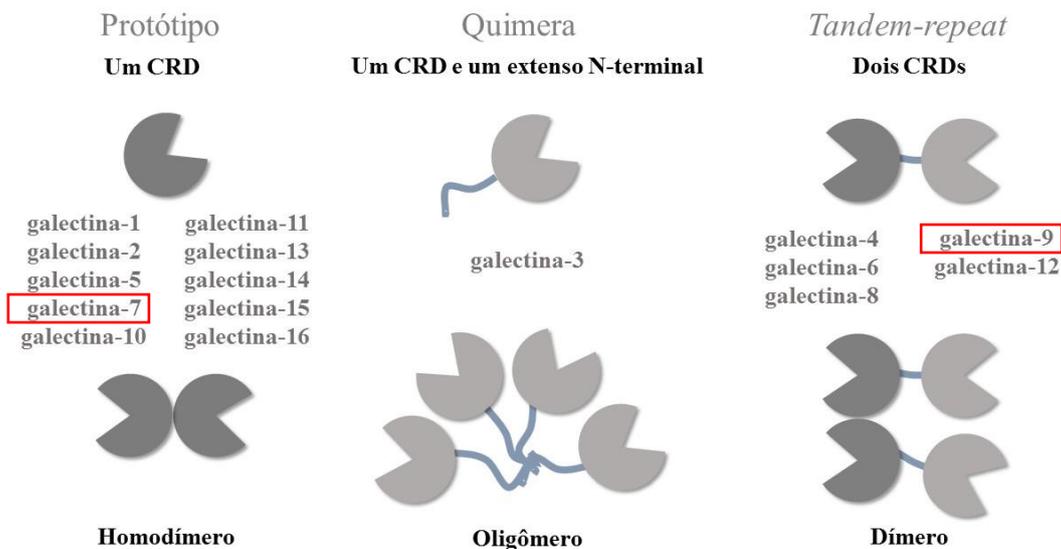
Fonte: RCSB Protein Data Bank (PDB)

<<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=3lse&bionumber=1&jmolMode=HTML5>>
<http://www.rcsb.org/3d-view/4XBQ/1> Acesso em março de 2018.

Anteriormente denominada de lectina de tipo S, as primeiras galectinas isoladas de vertebrados foram originalmente descritas em 1975 (VARKI et al., 2009). Atualmente, são conhecidas 16 galectinas de origem animal, que foram nomeadas por ordem de descobrimento (galectina-1 a galectina-16).

De acordo com o número de CRDs presentes na estrutura da proteína, as galectinas podem ser classificadas como: tipo protótipo, quimera ou *tandem-repeat* (FUJITA et al., 2017). As do tipo protótipo apresentam apenas um CRD, mas que podem formar homodímeros entre elas, enquanto a representante do tipo quimera apresenta um C-terminal CRD e um extenso domínio amino-terminal livre, rico em glicina, prolina e resíduos de tirosina que permitem a agregação com outras galectinas do mesmo tipo. As do tipo *tandem-repeat* contém dois CRDs ligados por um domínio peptídico de tamanho variável, que confere as diferentes propriedades biofísicas e funções dessas proteínas. (Figura 6) (KAMILI et al., 2016).

Figura 6 – Tipos de galectinas.



Fonte: Próprio autor (2017).

As diferenças de especificidade que cada CRD apresenta contribuem para os diferentes efeitos que as galectinas exercem sobre um único tipo celular. Elas podem formar homodímeros e multímeros que se ligam a estruturas glicosiladas com galactose na superfície e matriz extracelular, resultando em uma variedade de eventos envolvidos com a sobrevivência das células (BOJAROVÁ; KŘEN, 2016).

Sabe-se que as galectinas apresentam múltiplos papéis no núcleo, citoplasma, diferentes organelas, superfície celular e na matriz extracelular. Internamente, essas proteínas podem participar do controle da apoptose e do processo de splicing do mRNA (HEUSSCHEN; GRIFFIOEN; THIJSEN, 2013). No entanto, o mecanismo pelo qual as galectinas são secretadas para o meio extracelular ainda não é bem elucidado. Acredita-se que essas proteínas são transportadas diretamente do citoplasma para o meio extracelular, uma vez que não foi identificada a sequência de sinalização para o transporte clássico via retículo endoplasmático/golgi (JOHN; MISHRA, 2016). Uma vez no meio extracelular, as galectinas participam dos processos de comunicação celular, podem estimular sistemas de sinalização, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mobilização de cálcio intracelular, e secreção de fator de crescimento edotelial vascular (VEGF) (TIMOSHENKO et al., 2010).

Muitas galectinas possuem uma série de funções relacionadas ao estresse celular, ocasionando em respostas excitatória e inibitórias a depender do tipo e da localização desta proteína (Tabela 2) (ARTHUR et al., 2015).

Tabela 2 – Respostas relacionadas com o estresse celular e funções biológicas que são reguladas pelas principais galectinas.

Galectina	Efeitos estimulantes	Efeitos inibitórios
Humana		
Gal-1	Apoptose de células T ativadas Sobrevivência de células T naive Apoptose de células tumorais (mecanismo extracelular) Reparo muscular e diferenciação celular Migração e crescimento de células tumorais Proliferação de células tronco neurais Regeneração de axônios Angiogênese Mitogênese de células do baço, linfonodos, células vasculares e células estreladas do fígado	Viabilidade de células T Proliferação de células B Inflamação aguda Liberação de Oxido Nítrico a partir de macrófagos Crescimento do neuroblastoma e de células do estroma da medula óssea
Gal-3	Apoptose de monócitos e células T (mecanismo extracelular) Crescimento tumoral Crescimento e diferenciação de linfócitos Regulação da respiração em macrófagos e neutrófilos Morte de eosinófilos Angiogênese Inflamação	Apoptose de células T (mecanismo intracelular) Viabilidade de células T Inflamação Sobrevivência de células B ativadas Apoptose em linfoma de células B
Gal-7	Apoptose de células tumorais (mecanismo intracelular) Diferenciação de queratinócitos Apoptose de queratinócitos mediada por p53	Crescimento celular Proliferação celular

Gal-9	<p>Apoptose de células Th1, células T, Viabilidade de células T timócitos e células NK</p> <p>Maturação de células dendríticas</p> <p>Apoptose de células tumorais (mecanismo extracelular)</p> <p>Regulação da respiração celular (variedade de células)</p>
--------------	---

Fonte: modificado de TIMOSHENKO (2015)

2.2.1. Galectina-7

A galectina-7 é um membro das galectinas do tipo protótipo, cujo o gene LGALS7 localizado no cromossomo 19q13.2 é induzido pela p53. Esta, é principalmente expressa em células epiteliais estratificadas e é altamente regulada em resposta a radiação UVB em queratinócitos humanos normais (LABRIE et al., 2015). Sabe-se, que a sua expressão acontece principalmente em células epiteliais estratificadas do esôfago, língua, lábio, epiderme, epitélios orais, córnea, corpúsculos de Hassall do timo, sistema urinário, epitélio escamoso estratificado do estômago e células mioepiteliais mamárias (SATO et al., 2002; SAUSSEZ; KISS, 2006). Assim como as outras galectinas, Gal-7 carece de vias de sinalização para poder ser secretada para o meio extracelular, de modo que sua liberação também acontece por vias não-clássicas. Tem sido visto que uma fração da Gal-7 é constitutivamente localizada na mitocôndria, e que sua interação com a proteína anti-apoptótica Bcl-2, sugere seu papel regulador nos processos apoptóticos (VILLENEUVE et al., 2011).

Estudos recentes têm relatado níveis elevados de galectina-7 em diferentes tipos de câncer (Tabela 3). No entanto, os mecanismos subjacentes à sua regulação anormal em células cancerosas permanecem desconhecidos.

Tabela 3 – Expressão diferencial de Gal-7 no câncer.

Tipo de câncer	Localização celular
Adenocarcinomas	
Câncer de mama	Citoplasma, núcleo e mitocôndria
Carcinoma de células	

escamosas de cabeça e pescoço	Núcleo
Câncer cervical	
-Adenocarcinoma	Núcleo
-Carcinoma de células escamosas	Núcleo e citoplasma
Câncer de bexiga	
-Carcinoma de células escamosas	não documentado
-Carcinoma urotelial	
Câncer de ovário	Núcleo
Câncer gástrico e de colón	Citoplasma e núcleo
Câncer de tireoide	
Linfomas	não documentado
Melanomas	não documentado

Fonte: modificado de KAUR et al. (2016).

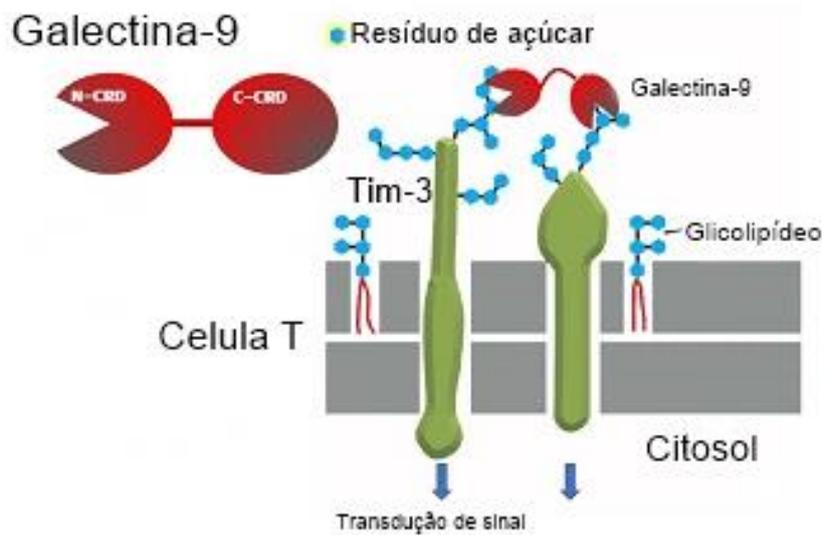
Nos últimos anos, vários estudos têm explorado o papel da galectina-7 no câncer. Essa proteína pode contribuir para a transformação neoplásica e para a progressão do tumor através da regulação do crescimento celular, angiogênese, apoptose, migração, ou pode ter um efeito protetor nas células tumorais, dependendo do tipo de tecido que se encontra.

2.2.2. Galectina-9

Galectina-9 (Gal-9), por sua vez, é uma glicoproteína que apresenta dois domínios de reconhecimento de carboidratos (LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A., 2015). 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.; THIJSEN, V. L., 2013). Muitos estudos têm demonstrado que Gal-9 induz apoptose de células T Tim-3 positivas, que estão relacionadas com funções de controle imune e realiza um papel central na mediação da

exaustão de células T no câncer (WANGA et al., 2018). No entanto, a literatura aponta um papel controverso da Gal-9 no câncer.

Figura 7 – Indução da apoptose de células T via Gal-9/Tim-3.



Fonte: modificado de DAPAT et al. (2017).

3 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

3.1 AMOSTRAS DE TECIDO E RECRUTAMENTO DE PACIENTES

Um total de 16 blocos parafinizados provenientes de tumores pancreáticos disponibilizados pelo serviço de patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) foram utilizados no estudo. Além disso, foram realizadas coletas de sangue de 34 novos pacientes de ambos os sexos, comprovadamente diagnosticados com câncer de pâncreas, com idade entre 40 e 70 anos. 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 (Anexo I) (CAAE: 44002815.2.1001.5205).

3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os blocos foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100, 95, 80, e 75%). Em seguida foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6.0 em micro-ondas 300W por 15 min. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com bloqueador de peroxidase endógena por 10 minutos e posteriormente o bloqueio das ligações inespecíficas com bloqueador proteico por 10 minutos a temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo anti-galectina-7 e anti-galectina-9 (1:50) diluído em PBS-BSA 5% durante o período de duas horas a 37°C. Após a incubação foi aplicado o sistema de amplificação do kit comercial Easylink One por 25 minutos a temperatura ambiente, e revelado com DAB-H₂O₂. Os controles positivos utilizados foram selecionados segundo indicação do fabricante do anticorpo anti-galectina-7 (pele normal) e do anticorpo anti-galectina-9 (estômago normal) e os controles negativos estabelecidos através da substituição do anticorpo secundário por anticorpo anti-IgG humana inespecífica (DAKO). As fotografias foram realizadas utilizando Microscópio Zeiss com o sistema de captura de imagem ZEN 2011 (blue edition).

3.3 DOSAGEM DE GALECTINA (ELISA)

Níveis de galectina-7 e -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 78,125 pg/ml – 10.000 pg/ml.

3.4 CULTIVO DE CÉLULAS

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.

As linhagens eram mantidas em garrafas de cultivo, e quando alcançavam uma confluência de cerca de 80%, estas eram submetidas aos protocolos experimentais. A adesão das células foi realizada com PBS-EDTA e Tripsina 0,25% (Invitrogen) por 5-10 minutos. A inativação da tripsina foi feita com meio completo e as células foram recuperadas em volume definido.

3.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a extração proteica, as células previamente condicionadas em garrafas de 25mm² numa concentração de 2.10^6 foram tratadas com um tampão detergente (50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 0,1% triton x-100, 1mM Na₃VO₄, 1mM de PMSF, 2g/mL de aprotinina) e centrifugada a 13.000 rpm durante 15 minutos. Em seguida foi utilizado o tampão de lise nuclear (50mM Tris, 1% Tween 20, 0,25% deoxicolato de sódio, 150mM NaCl, 1mM de EDTA, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF e 2µg/mL aprotinina) e centrifugado nas mesmas condições.

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando-se o QuantiPro™ BCA Assay Kit para Ensaio de Proteínas (Lowry modificado), da Sigma-Aldrich®, de acordo com o manual do fabricante. Para leitura das amostras, foi utilizado um leitor de microplacas (Bio-RAD® USA) com filtro para 570nm.

3.6 WESTERN BLOTTING

A partir dos extratos proteicos obtidos, foi realizada eletroforese vertical em gel de 30% acrilamida/0,8% bisacrilamida para separar as proteínas de acordo com sua massa molecular aparente. Em seguida, realizada a transferência *semidry* para membrana de PVDF (GE Healthcare Life Sciences®) por 20 minutos e o bloqueio de ligações inespecíficas com PBS-BSA 5% por 1 hora. A membrana foi incubada com anticorpo

primário anti-galectina-7 *overnight*, e o anti- β -actina foi usado como normalizador. Após isso, num período de duas horas, foi feita a incubação com os anticorpos secundários à temperatura ambiente e posterior revelação por quimioluminescência (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) segundo as recomendações do fabricante (GE Healthcare Life Sciences®).

3.7 ENSAIO DE INTERVENÇÃO (GALECTINA-7 RECOMBINANTE)

As linhagens MiaPaCa-2 e PANC-1 foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas com galectina-7 recombinante (rhGal-7) nas doses de 2.5ug/ml e 5ug/ml em 200ul de meio de cultura por 24h.

3.8 ANÁLISE DE MORTE E CICLO CELULAR (CITOMETRIA DE FLUXO)

As células foram inicialmente lavadas com PBS1x e fixadas com Etanol a 70%, em seguida foram realizadas duas lavagens com PBS1x e submetidas a centrifugações de 2.800 rpm por 5 minutos entre cada etapa. O pellet celular foi ressuspensionado em solução de PI (PBS 1X, Triton X-100 0,1%, RNase A 20mg/mL e PI 5mg/mL) e incubado durante 30 minutos, protegido da luz. As amostras foram analisadas pelo citômetro de fluxo BD Accuri C6.

3.9 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

As células foram distribuídas em placas de 24 poços, numa concentração de $2 \cdot 10^5$, e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas, para que alcançassem uma confluência de aproximadamente 90%. Após esse período, com o auxílio de uma ponteira, foi realizado um risco/traço na monocamada celular, para dar origem a um espaço entre as células. As células foram tratadas com 2,5ug/ml e 5ug/ml de rhGal-7 nos períodos de 0, 2, 6, 12 e 24 horas. Foi realizada a captura das imagens utilizando o microscópio Eclipse Ts2 (Nikon).

3.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células foram distribuídas sobre lamínulas dispostas em placas de 24 poços numa concentração de $2 \cdot 10^4$. Após o período de 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 7%. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com PBS/BSA 5% por 1 hora, seguida pela incubação com os anticorpos primários anti-galectina-7 (1:100), anti-BAX (1:50), anti-Ki-67 (1:50), anti-vimentina (1:50), anti-Bcl-1 (1:50), anti-E-caderina (1:50) e anti-GRP78 (1:50) *overnight*. Após esse período, as células foram marcadas por duas horas com anticorpo secundário anti-mouse conjugado Texas Red e conjugado FITC. A marcação nuclear com o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) foi realizada no período de 15 minutos. As imagens foram

capturadas e analisadas através do microscópio de fluorescência EVOS® FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism® versão 6. Os dados foram analisados por Teste t-Student, sendo as diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 GALECTIN-7 CHARACTERIZATION IN HUMAN SERUM, TISSUE AND CELL MODELS OF PANCREATIC ADENOCARCINOMA

Lucas Batista Tavares¹; Antônio Felix da Silva Filho^{1*}; Kamila de Melo Vilar¹; Maira Galdino da Rocha Pitta¹; Mário Rino Martins²; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹;

1. Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT / Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino - NUPIT SG, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE- Brasil.

2. Hospital do Câncer de Pernambuco - HCP, Recife - PE – Brasil.

Correspondence:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil.

e-mail: moacyr.rego@gmail.

ABSTRACT: Pancreatic cancer is associated with poor prognosis, late diagnosis, and resistance to currently available treatments. Galectin-7 (Gal-7) has altered expression in many types of cancer and has a controversial activity depending on the tissue in which it is located. This study aimed to evaluate the expression of Gal-7 in pancreatic adenocarcinoma. The expression of Gal-7 in pancreatic tumor tissues and serum was evaluated by Immunohistochemistry and ELISA. Cell location, protein expression and secretion of Gal-7 was investigated in two cell lines by immunofluorescence, western blotting and ELISA. The interventional assay was performed by adding recombinant Gal-7 (rhGal-7) in the culture medium. The migratory capacity and expression of apoptosis, proliferation, autophagy, endoplasmic reticulum stress and epithelial transition / mesenchymal markers were investigated. PDAC patients were Gal-7 positive in tissue and serum level. Expression and secretion of Gal-7 in pancreatic cancer cell lines were negative. The intervention assay with recombinant rhGal-7 showed that Gal-7 can enhance the proliferation marker and reducing the autophagy and endoplasmic reticulum

stress markers in PANC-1 and elevating expression of the proliferation, apoptosis, and autophagy marker in MiaPaCa-2.

Key-words: pancreatic adenocarcinoma, β -galactoside, clinical-pathological analyses.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), the most frequent form of pancreatic cancer, continues to be one of the most lethal human malignancies (TORRES, C.; GRIPPO, P. J., 2018). One of the major hallmarks of PDAC is its early systemic dissemination, with extensive local tumor spread. Despite notable efforts to develop novel therapeutic targets, PDAC is still highly resistant to therapy, with a median survival of 4-6 months and a 5-year survival rate lower than 5%. Despite the low incidence when compared to other tumors, pancreatic cancer is responsible for high mortality rates in individuals over 55 years old (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Pancreatic cancer systemic chemotherapy is often based in gemcitabine alone or FOLFIRINOX regimen (GUPTA; AMANAM; CHUNG, 2017).

Altered glycosylation is a common feature of several cancers, including pancreatic cancer. The glycoprofile of PDAC involves a differential expression of galectins, like galectin-1, -3 and -4, already described in literature (MAFTOUH, et al., 2014). The expression of galectins is modulated during the development of individual cells and can be altered under different physiological or pathological conditions. Galectins are often overexpressed in cancerous cells and cancer-associated stromal cells (BELO, et al., 2013). The galectins are secreted by an unconventional pathway and thus can be localized in the extracellular compartment. However, they are also found in the cytosol, in the nucleus, or even in the mitochondria. These proteins showed high affinities for specific oligosaccharides, which make these molecules promising markers as well as therapeutic targets for studying their role in etiology of cancer.

Galectin-7 is a prototype galectin member, containing one carbohydrate recognition domain (CRD, implicated in cell adhesion, migration and was associated with metastatic potential of various tumor tissues, notably in breast cancer (CAMPION, C. G. et al., 2013). It can act as a potent dual regulator in several types of cancer. Galectin-7 may contribute either to neoplastic transformation and tumor progression through regulation of cell growth, cell cycle, angiogenesis, apoptosis and cell migration or may

have a protective effect in cancer depending on the tissue type (ADVEDISSIAN, T.; DESHAYES, F.; VIGUIER, M., 2017).

In this study, we focus on characterize serum and tissue expression of Galectin 7 (Gal-7) in PDAC samples as well as to evaluate the role of Gal-7 in cell models.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Sixteen patients with PDAC, diagnosed between 2013 and 2016, were selected from the Service Registry of the Pernambuco Cancer Hospital - HCP. Local Ethical Board for Human research approved all samples achievement (CAAE: 39976214.90000.5205). The clinical specimens were previously fixed in formalin buffered and embedded in paraffin. Following variables were collected in medical charts: age, sex, extension of the surgery performed, therapeutic modality, surgical staging, lymph node involvement, histological grade, submission to chemotherapy and radiation therapy, and recurrence.

ELISA

Galectin-7 levels in pancreatic adenocarcinoma serum patients and supernatant of the Mia PaCa-2 and PANC-1 cell lines were quantified by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich, following the information recommended by the suppliers (R & D Systems). The evaluations were done in duplicate, with kit detection limit between 78.125 pg / ml - 10,000 pg / ml.

Immunohistochemistry

Biopsy slices (4 μ m) were deparaffinized with xylol and rehydrated in graded ethanol (100%, 95%, 80% and 70%). Antigen retrieval was done using 100mM citrate buffer, pH 6.0 in microwave 300W for 15 min. Endogenous peroxidase blocker was performed with hydrogen peroxide 3% for 30 min at room temperature followed by blocking the non-specific binding (phosphate-buffered saline-1% bovine serum albumin (PBS-BSA) for at same conditions. The primary antibody anti-galectin-7 (Santa Cruz Biotechnology) was diluted in 1% PBS-BSA and the samples were incubated for 18h at 4°C or 2h at 37°C. The amplification system (Easylink On, ImmPRESS™ and DAKO EnVision™) was applied between 30 to 50 min at 25°C. Reaction was visualized with diaminobenzidine (DAB-H₂O₂) and tissues were counterstained with hematoxylin. Positive control was used following the antibody manufacturer's designation and the negative controls were established by replacing the primary antibody with anti-human IgG (DAKO) antibody.

Image analysis

Histomorphological analysis was performed with an integrated image system (BIOPTICA B20) microscope coupled to a CMOS camera (2584 x 1936 pixels resolution) with ISCapture image capture software. Samples with marking in more than 10% of the neoplastic cells in different degrees of intensity were considered positive and those that did not present were negative. Semi-quantitative analysis of the stained cells was done by analyzing ten random fields in each case and the stained cells were counted using ImageJ Software.

Cell Culture

Pancreatic tumor lineages Mia PaCa-2, PANC-1 were obtained from the Banco de Células do Rio de Janeiro. They grew in Dulbecco's modified Eagle's médium with bovine fetal serum 10% (BFS) (Cultilab), antibiotic, HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) and sodium bicarbonate, with addition of 2.5% horse serum (Cultilab) for Mia PaCa-2. Their maintenance was carried out in an atmosphere with CO₂ 5% at 37°C.

Protein extraction

Cells were previously washed twice with ice cold PBS and lysed with detergent buffer composed of 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100. A cell monolayer was removed using a small scraper and its fragments inserted into sterile tubes for centrifugation (13,000 rpm for 15 min at 4 ° C). This step aims to obtain the soluble protein fraction. The nuclear fraction is acquired with an addition of nuclear lysis buffer composed of 20 mM Hepes, 630 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% Glycerol. The centrifugation step was performed in the same manner as the first. Both as fractions were pooled and added with 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The fractions were homogenized, and a protein dosage was performed with the QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich®). To read the samples, a microplate reader (Bio-RAD® USA) and wavelength of 570nm were used.

Western Blotting

The extracted protein samples were quantified and submitted to 12% acrylamide / bisacrylamide gel electrophoresis. The gel intended for molecular separation contains Tris 0.375M pH 8.8, 0.1% SDS, 10% acrylamide, 0.03% ammonium persulfate (APS) in N, N, N-tetramethylethylenediamine (TEMED, Sigma) while the stacking gel is amenable to 0.125 M TRIS pH 6.8, 0.1% SDS, 4% acrylamide, 0.045% APS, and TEMED. Electrophoresis was performed and followed by semidry transfer to PVDF membrane (Hydrophobic polyvinylidene difluoride, Amersham - GE Healthcare Life Sciences) for

20 minutes at 100 V. After blocking nonspecific bindings with 5% (w / v) PBS/BSA for 1 hour at room temperature (RT), the membrane was incubated with goat anti-galectin-7 D-5 (1:1000) and goat anti- β actin C4 (1:10000) provided by Santa Cruz Biotechnology diluted in the blocking solution kept overnight at 4 ° C. On the following day, incubation with the secondary anti-mouse antibody for 2 hours T.A. was performed followed by chemiluminescent (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) as recommended by the manufacturer (GE Healthcare Life Sciences).

Intervention test (recombinant Galectin-7)

MiaPaCa-2 and PANC-1 cell lines were plated in 24 well plates and incubated with recombinant galectin-7 (rhGal-7) at 2.5ug / ml and 5ug / ml in 200ul of culture medium for 24h.

Cell viability

Cells were first washed with PBS1x and fixed with 70% Ethanol, then two washes were performed with PBS1x and subjected to 2,800 rpm centrifugations for 5 minutes between each step. The cell pellet was resuspended in PI solution (1X PBS, 0.1% Triton X-100, 20mg / mL RNase and 5mg / mL PI) and incubated for 30 minutes, protected from light. The samples were analyzed by the Accuri C6 BD flow cytometer.

In-vitro scratch assay

PDAC lineage cells were distributed in 24-well plates at a density of 2×10^5 cells/well and incubated at 37°C in atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. After reaching the required confluence, growth medium was aspirated and washed with PBS 1 ×. Then, one line was made using a p200 pipette tip. Cells were photographed in inverted microscope Eclipse Ts2 (Nikon) (t=0 h) and incubated for 2 h (t= 2 h), 6 h (6= 6h), 12 h (t= h) and 24 h (t= 24 h).

Immunofluorescence

PDAC lineage cells were grown on coverslips in 24-well plate (2×10^4 cells/well). After 24 h, the medium was then replaced by fresh medium containing both doses 2,5 μ g/ml and 5 μ g/ml of rhGal-7. The plate was then incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 h. After incubation, the cells were washed with PBS and then fixed with paraformaldehyde 7% for 15 min and permeabilized with 0.5% Triton (SigmaAldrich) at room temperature. Thereafter, cells were incubated overnight with primary antibodies mouse monoclonal, anti-Ki67, anti-BAX, anti-Beclin-1, anti-Vimentin, anti-GRP-78 and anti-E-cadherin at 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) at 4°C. Then, the secondary antibodies (1:300) conjugated with fluorescein (FI-2000) or with Texas

Red (TI-2000), both from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, California, USA) were added for 2 h. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) 1:3000 for 15 min. Cells were visualized with Imaging Station fluorescence microscope (Eclipse Ts2 Nikon). All immunofluorescence images were recorded at $\times 10$ objective.

Statistical analysis

Fisher's exact test was performed in GraphPad Prism version 6.0. $p < 0.05$ was considered significant. Analysis of outcome was evaluated through log-rank method and Kaplan-Meier survival curves.

RESULTS

PDAC Patients were Galectin-7 Positive in Tissue and Serum Level

Of 16 patients, 8 were Gal-7 positive. Immunohistochemical analysis showed that this samples had a cytoplasmic staining pattern with heterogeneous and focal staining in neoplastic cells. Non-tumor associated structures (endothelial and inflammatory cells) presented a homogeneous staining for Gal-7 (Figure 1A).

PADC (n = 34) and control volunteers (n = 66) were paired by sex ($p = 0.11130$) and age ($p = 0.1205$). Females represents 71% of PADC cases and 81% of control volunteers. The median age of control group and PADC group were 62 and 64 years, respectively.

Serum Gal-7 was significantly higher in the PDAC patients (625.0 [14176,6- 14,6 pg/ml]) than healthy group (23.43[3744- 23,43 pg/ml]) (Figure 1B).

Galectin-7 characterization and Influence in PDAC Lineages.

Through immunofluorescence and western blot was possible to verify that PDAC lineages have low basal levels of Gal-7 expression (Figure 2A and B). To evaluate its function, we added hr-Gal7 in culture medium in different concentrations and time. The rhGal-7 did not induce increased cell death at any time and concentration analyzed (data not show). Was not observed alterations in PANC-1 and Mia PaCa-2 migration after treatment with different concentrations of hr-Gal-7 (Figure 3A and 3B). However, addition of 2,5 and 5 $\mu\text{g/ml}$ of Gal-7 in the PANC-1 medium caused an increase in its Ki67 expression and a reduction of Beclin and GRP78 (Figure 4A, B and C). The increase in Ki67 expression was also observed after Gal-7 treatment for Mia PaCa-2. Moreover, BAX and Beclin staining increased at 2,5 and 5,0 $\mu\text{g/ml}$ Gal-7 concentrations, respectively in Mia-Paca-2 Cells (Figure 5A and B).

DISCUSSION

The present study aimed to evaluate the expression of galectin-7 in pancreatic cancer, trying to identify the presence of this protein in pancreatic adenocarcinoma patient tissues and sera and to understand its functions in in vitro models.

We identified that Gal-7 is expressed by malignant cells in pancreatic tumors in an ex vivo experiment and it is present in tumor associated endothelial cells, vessels and in the cellular infiltrate present in that tissue; such results were not found in previous studies in the literature.

In addition, there is an association of the Gal-7 serum levels with the pancreatic cancer. However, in vitro model to investigate the expression and cellular location of Gal-7 proposed in this study, does not identify the presence of this protein.

The altered expression of galectin-7 is involved in tumor progression through regulation of cell proliferation and invasion. However, galectin-7 may contribute to the suppression of proliferation in certain types of tumors and induce the growth and metastasis in others (BARKAN et al., 2013).

The controversial role of Gal-7 has been the subject of many studies on various types of cancer. KIM et al. (2013) investigated the expression of galectin-7 in gastric cancer, that observed a low expression of this protein in the tumor tissue, compared to the normal organ. And it has been proven that the decrease in Gal-7 levels in tumor tissue was associated with disease progression. Genomic analyzes have shown that in 7 of 9 gastric cancer cell lines, there was more than 70% hypermethylation of DNA in the coding region of Gal-7. These data suggest the tumor suppressor role of this protein, and that its gene undergoes epigenetic modification by DNA methylation in gastric cancer (KIM et al., 2013).

In studies that sought to associate the p53 gene with Gal-7 expression in lymphoma, it has been proven by polymerase chain reaction for specific methylation that Gal-7 expression undergoes changes in DNA methylation in some types of cancer. This conclusion was supported by the data generated in the use of the 5-aza-dC demethylating agent. In addition, the inhibition of dnmt1 and dnmt3a DNA methylases induces the expression of galectin-7 (DEMERSA et al., 2009).

Intervention with rhGal-7 showed that both cell lines respond to the presence of this protein in the medium. PANC-1 cell line increases expression of the proliferation marker (Ki-67) and decreases autophagy (Bclin-1) and endoplasmic reticulum stress (GRP78)

markers in response to rhGal-7. While MiaPaCa-2 increases Ki-67, Bcl-1 and apoptosis marker BAX expression, in a rhGal-7 concentration-dependent.

The ability of Gal-7 to activate signaling pathways and induce expression of proteins involved with cell survival is dose and time dependent, as shown in the BIBENS-LAULAN (2017) study, in which rhGal-7 plays a central role in intracellular control, either in the cytosolic or mitochondrial compartment, via endocytosis and induction of gene transcription in breast and ovarian cancer cell lines.

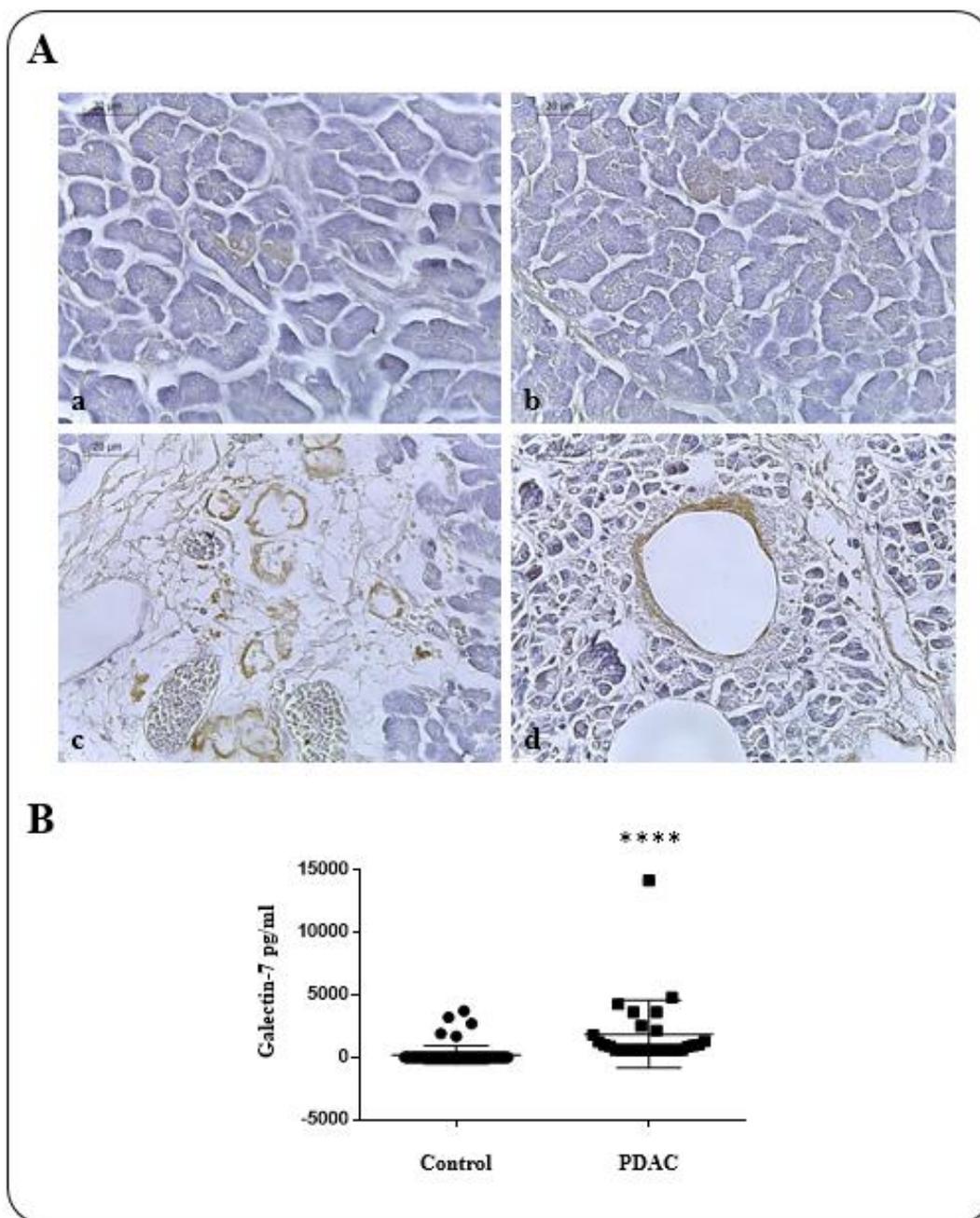


FIGURE 1. A, Immunohistochemical evaluation of Gal-7 in tissue samples from pancreatic tumors. B, Serum levels of Gal-7 in the serum of healthy volunteers and diagnosed with pancreatic cancer. (**** = $p < 0.0001$). Control = control sera from healthy volunteers. PDAC = pancreatic cancer sera.

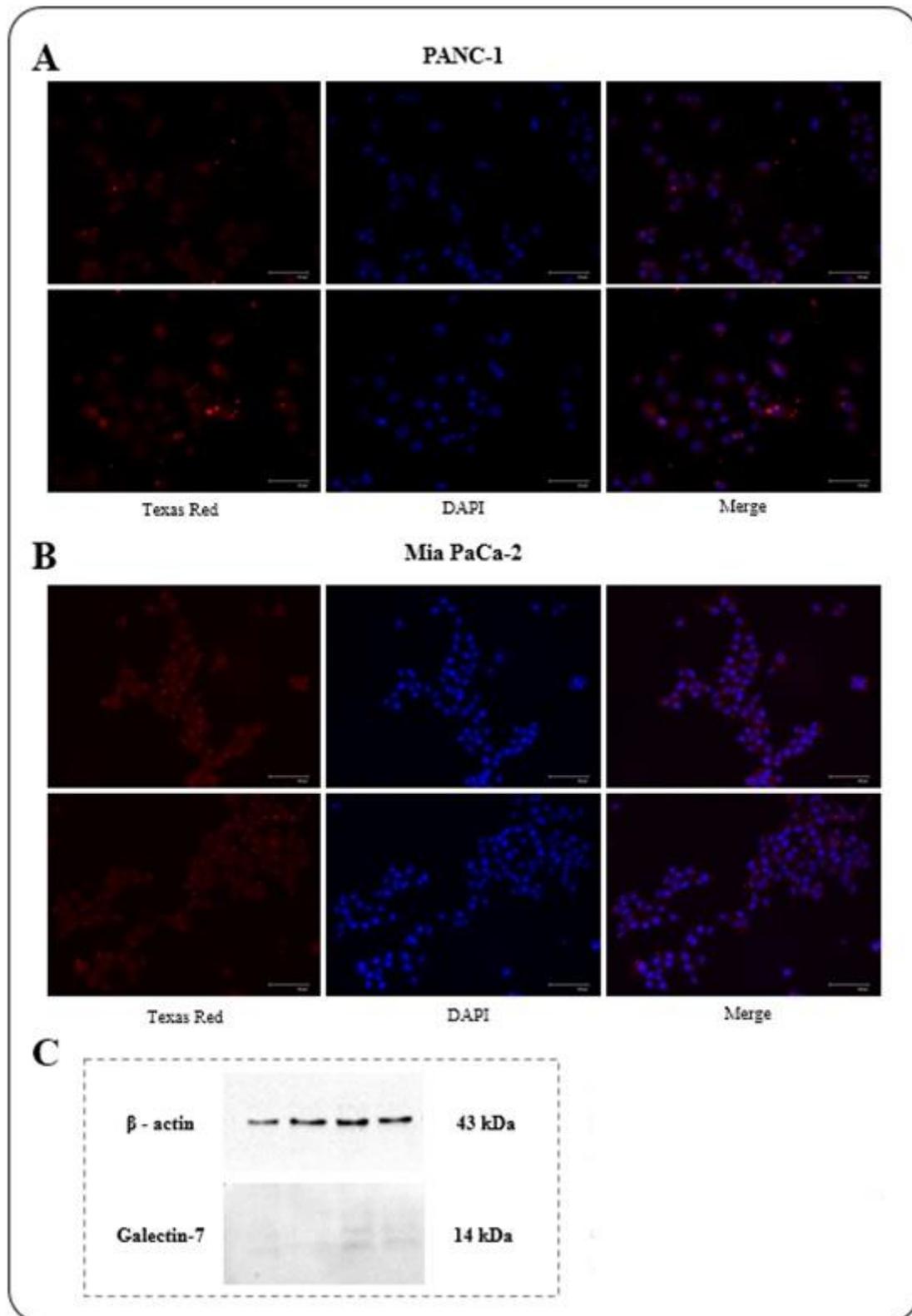


FIGURE 2. Immunofluorescence to detect Gal-7. A, PANC-1; B, MiaPaCa-2; C, Western Blotting to Gal-7 in lysate cell line of PANC-1.

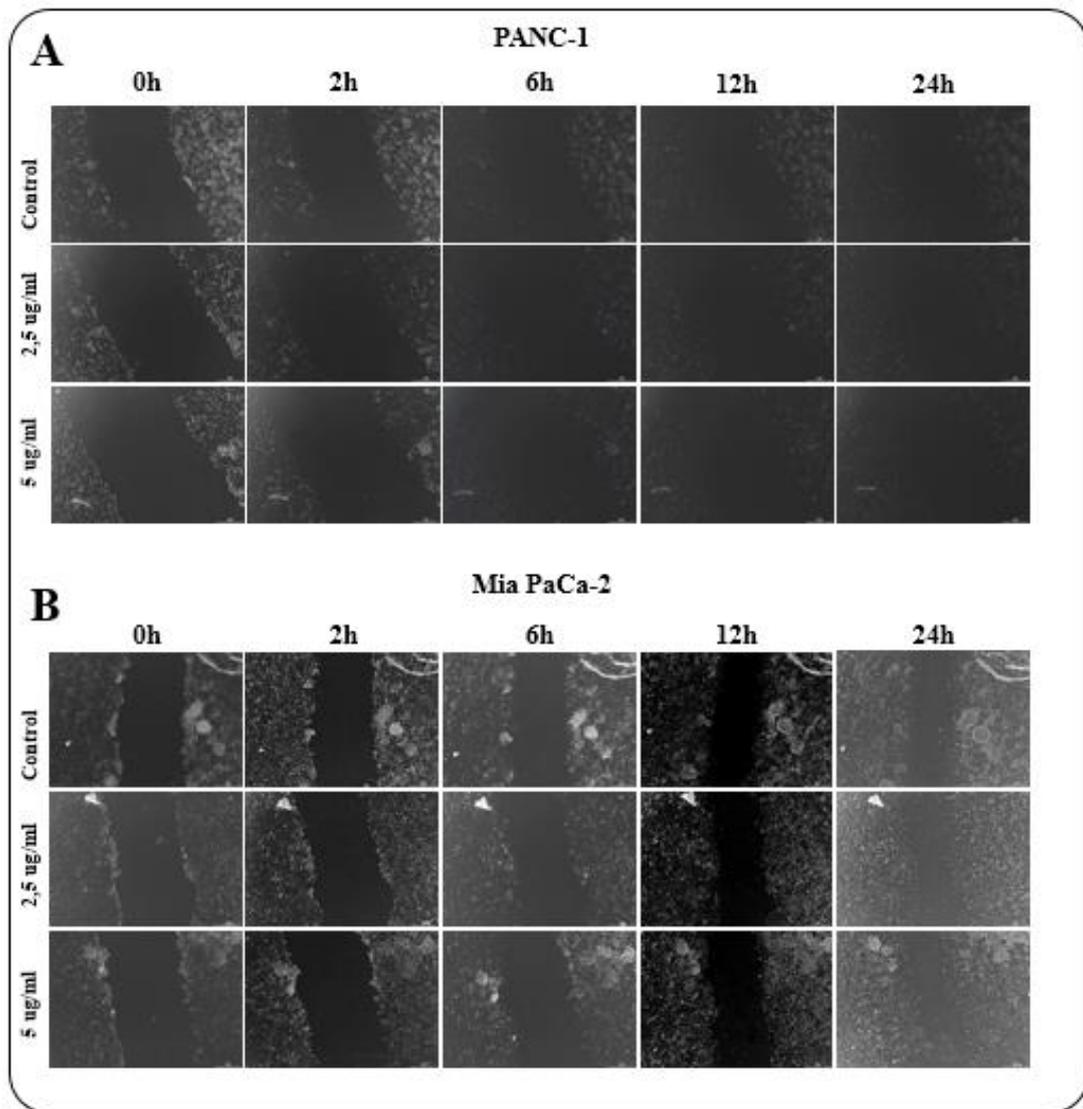


FIGURE 3. In-vitro scratch assay. A, PANC-1; B, MiaPaCa-2. Concentrations of recombinant Gal-7: 2,5 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$. Times: 0, 2, 6, 12 and 24 hours.

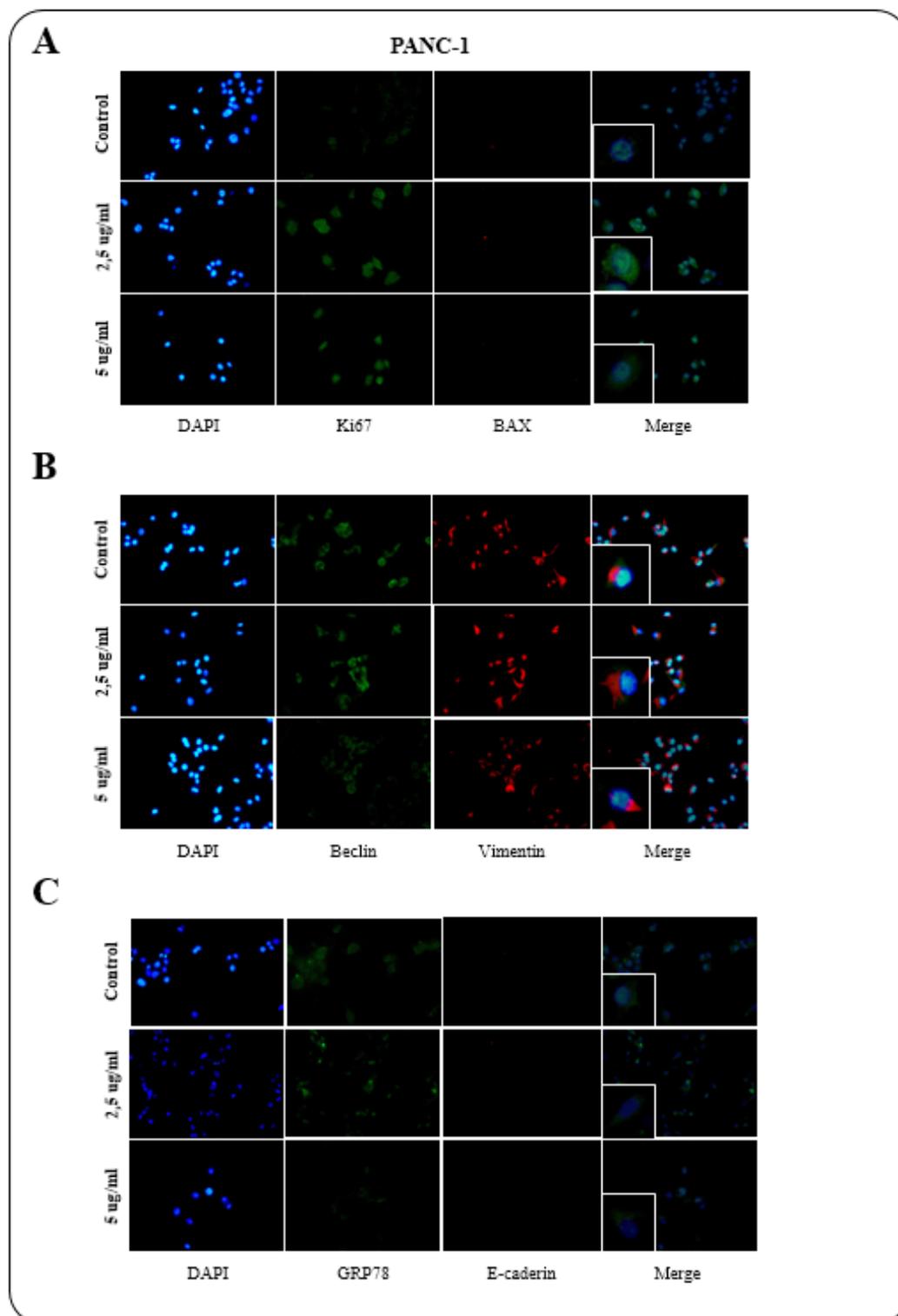


FIGURE 4. Immuno-fluorescence to detect Ki-67, BAX, Bcl-1, Vimentin, GRP78 and E-cadherin in PANC-1. Concentrations of recombinant Gal-7: 2,5 $\mu\text{g/ml}$ and 5 $\mu\text{g/ml}$. Times: 0, 2, 6, 12 and 24 hours.

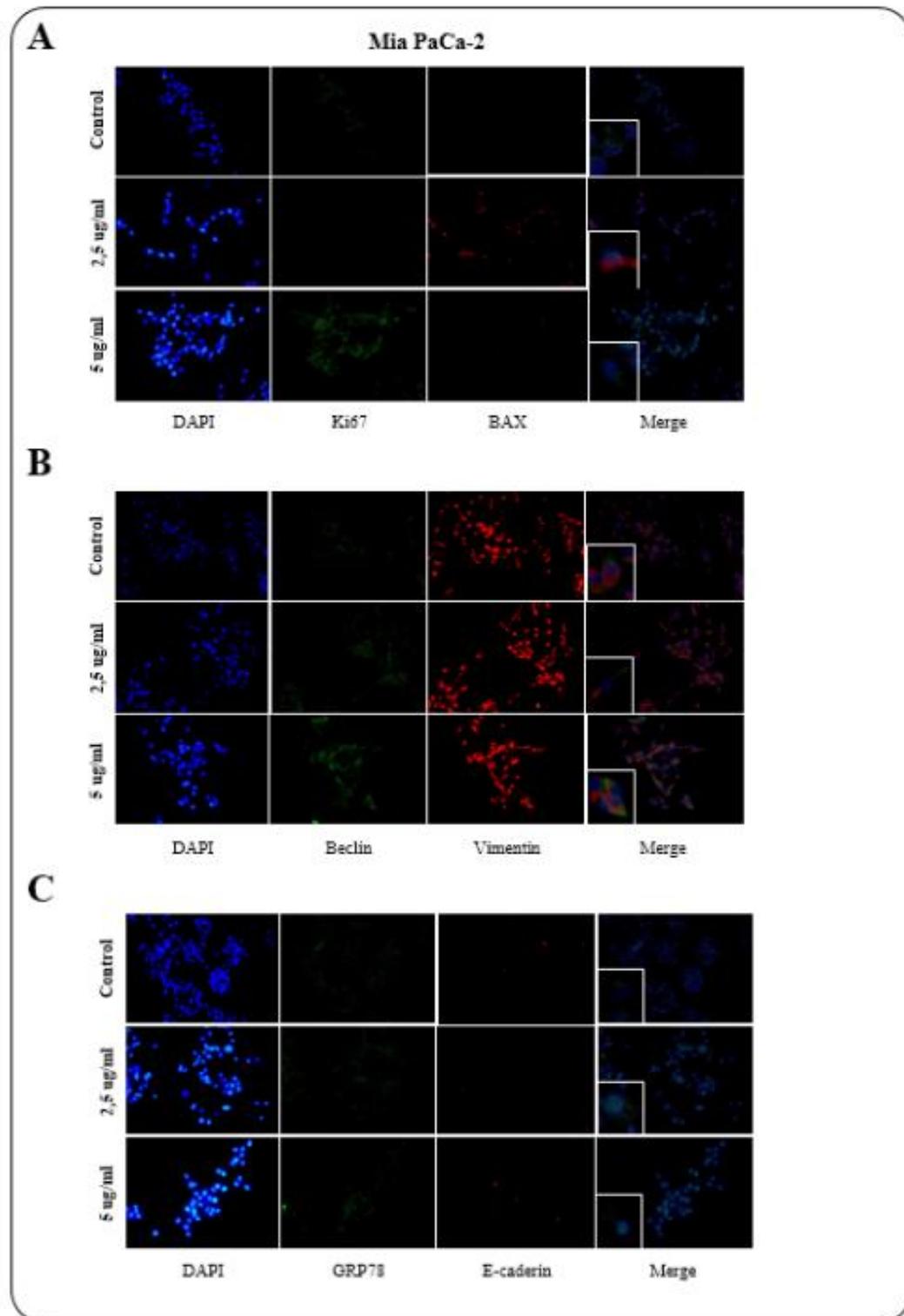


FIGURE 5. Immuno-fluorescence to detect Ki-67, BAX, Bcl-1, Vimentin, GRP78 and E-cadherin in Mia PaCa-2. Concentrations of recombinant Gal-7: 2,5 µg/ml and 5 µg/ml. Times: 0, 2, 6, 12 and 24 hours.

REFERENCES

- ADVEDISSIAN, T.; DESHAYES, F.; VIGUIER, M. Galectin-7 in Epithelial Homeostasis and Carcinomas. **Int J Mol Sci.** 19;18(12). 2017.
- BARKAN B, COX AD, KLOOG Y. Ras inhibition boosts galectin-7 at the expense of galectin-1 to sensitize cells to apoptosis. **Oncotarget**, 4(2):256–268. 2013.
- BELO, A. I; VAN DER SAR, A. M.; TEFSEN, B.; VAN DIE, I. Galectin-4 Reduces Migration and Metastasis Formation of Pancreatic Cancer Cells. **PLoS One.** 8(6): e65957. 2013.
- BIBENS-LAULAN, N; ST-PIERRE Y. Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7. **Plos One.** 2017.
- CAMPION, C. G.; LABRIE, M.; LAVOIE, G.; ST-PIERRE, Y.; Expression of Galectin-7 Is Induced in Breast Cancer Cells by Mutant p53. **PLOS one.** 2013.
- DEMERSA, M.; COUILLARDA, J.; GIGLIA-MARIC, G.; MAGNALDOB, T.; ST-PIERREA, 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.
- GUPTA, R.; AMANAM, I.; CHUNG, V. Current and future therapies for advanced pancreatic cancer. **J Surg Oncol.** 116(1):25-34. 2017.
- 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
- MAFTOUH, M.; BELO A. I.; AVAN, A.; FUNEL, N.; PETERS, G. J.; GIOVANNETTI, E.; VAN DIE, I. Galectin-4 expression is associated with reduced lymph node metastasis and modulation of Wnt/ β -catenin signalling in pancreatic adenocarcinoma. **Oncotarget.** 5(14): 5335–5349. 2014.
- SIEGEL R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA Cancer J Clin.** 67(1):7-30. 2017.
- TORRES, C.; GRIPPO, P. J. Pancreatic Cancer Subtypes: A Roadmap for Precision Medicine. **Ann Med.** 14:1-18. 2018.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar a expressão da galectina-7 e -9 no câncer de pâncreas, tentando identificar a presença dessas proteínas no tumor pancreático, nos níveis circulantes em voluntários acometidos por esse tipo de câncer e compreender seu mecanismo de ação em modelos *in vitro*.

Este trabalho identificou que Gal-7 é expressa pelas células malignas em tumores de pâncreas, em experimento *ex-vivo*, e está presente em células endoteliais dos vasos associados ao tumor e no infiltrado celular presente nesse tecido; tais resultados não foram encontrados em trabalhos prévios da literatura. Além disso, existe uma associação dos níveis séricos dessa proteína com a presença de neoplasias malignas do pâncreas. No entanto, o modelo de investigação *in vitro* para investigar a expressão e localização celular da Gal-7 proposto nesse trabalho, não identifica a presença dessa proteína.

A regulação da apoptose pela galectina-7 tem sido estudada ao longo dos últimos anos. Acredita-se que esta regulação envolva a ativação de JNK, liberação mitocondrial de citocromo c e ligação de Bcl2 na membrana mitocondrial. A expressão alterada da galectina-7 está envolvida na progressão do tumor através da regulação da proliferação e invasão celular. No entanto, a galectina-7 pode contribuir para a supressão da proliferação em certos tipos de tumores e induzir o crescimento e a metástase de outros (BARKAN et al., 2013).

Então, o papel controverso da Gal-7 tem sido alvo de muitos estudos em vários tipos de câncer. KIM et al. (2013) investigou a expressão da galectina-7 em câncer gástrico, quando observou uma baixa expressão dessa proteína no tecido tumoral, em relação ao órgão normal. E foi comprovado que a diminuição dos níveis de Gal-7 no tecido tumoral estava associada com o avanço da doença. Análises genômicas comprovaram que em 7 de 9 linhagens celulares de câncer gástrico, haviam mais de 70% de hipermetilação do DNA na região codificante de Gal-7. Esses dados sugerem o papel supressor tumoral dessa proteína, e que seu gene sofre modificação epigenética por metilação do DNA em câncer gástrico (KIM et al., 2013).

Em estudos que buscavam a associação do gene de p53 com a expressão de Gal-7 em linfoma, foi comprovada por reação em cadeia de polimerase para metilação específica, que a expressão de Gal-7 sofre mudanças na metilação do DNA em alguns tipos de câncer. Esta conclusão foi apoiada pelos dados gerados na utilização do agente de desmetilação 5-aza-dC. Além disso, a inibição das DNA metilases *dnmt1* e *dnmt3a* induz a expressão da galectina-7 (DEMERSA et al., 2009).

A intervenção com rhGal-7 mostrou que ambas as linhagens celulares respondem à presença dessa proteína no meio. A linhagem PANC-1, aumenta a expressão do marcador de proliferação (Ki-67) e diminui os marcadores de autofagia (Bclin-1) e estresse do retículo endoplasmático (GRP78) em resposta à rhGal-7. Enquanto MiaPaCa-2 aumenta a expressão de Ki-67, Bclin-1 e do marcador de apoptose BAX, de forma concentração de rhGal-7 dependente.

A capacidade da Gal-7 de ativar vias de sinalização e induzir expressão de proteínas envolvidas com a sobrevivência celular, é dose e tempo dependentes, como mostrado no estudo de BIBENS-LAULAN; ST-PIERRE, 2017, no qual rhGal-7 desempenha um papel central no controle intracelular, seja no compartimento citosólico ou mitocondrial, via endocitose e indução da transcrição do gênica em linhagens celulares de câncer de mama e ovário.

Já a análise de Gal-9, realizada através da imunomarcção tecidual e dosagem no soro, viu-se que esta proteína é altamente expressa no tecido tumoral, tanto pelas células malignas, quanto no estroma e estruturas endoteliais associados ao tumor. E a alta expressão tecidual é refletida nos seus níveis séricos, cuja concentração circulante é consideravelmente maior em todos os casos em relação aos níveis sorológicos de indivíduos saudáveis.

Este é o primeiro estudo de avaliação dos níveis séricos de Gal-9 em pacientes com PDAC. Gal-9 apresenta uma expressão notável tanto no soro, quanto no tecido de casos de câncer de pâncreas. Até o momento, o papel de Gal-9 nesse tumor não é totalmente compreendido e a literatura relata função dual dessa proteína (WANG, et al., 2018).

A alta expressão de Gal-9 está associada à sua capacidade de promover uma supressão imune adaptativa, baseado na sua capacidade de ligação com o receptor Declin 1 em macrófagos tumorais no câncer de pâncreas (OKURA et al., 2018).

No entanto, a Gal-9 também está associado a efeitos antitumorais pela supressão da proliferação celular e induzindo a apoptose intrínseca através de vias dependentes e independentes de caspase em tumores de pâncreas (DALEY et al., 2017).

6 CONCLUSÕES

- A Galectina-7 é expressa nos tumores de pâncreas, enquanto a galectina-9 apresenta expressão positiva nas células do adenocarcinoma de pancreático;
- Pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de pâncreas apresentam níveis séricos de Gal-7 e Gal-9 elevados, quando comparados aos voluntários sadios.
- A Gal-7 sofre regulação de expressão gênica e pode estar silenciada nos modelos celulares de câncer de pâncreas;
- A Gal-7 é capaz de aumentar o marcador de proliferação e reduzir os marcadores de autofagia e estresse do retículo endoplasmático em PANC-1 e elevar a expressão do marcador de proliferação, apoptose e autofagia em MiaPaCa-2;

REFERÊNCIAS

- ALGUL, H.; TREIBER, M.; LESINA, M.; SCHMID, R. M. Mechanisms of disease: chronic inflammation and cancer in the pancreas—a potential role for pancreatic stellate cells? **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, 4:454–462. 2007.
- ARTHUR, C. M.; BARUFFI, M. D.; CUMMINGS, R. D.; STOWELL, S. R. Evolving mechanistic insights into galectin functions. **Methods Mol Biol**, 1207:1–35. 2015.
- BARKAN B, COX AD, KLOOG Y. Ras inhibition boosts galectin-7 at the expense of galectin-1 to sensitize cells to apoptosis. **Oncotarget**, 4(2):256–268. 2013.
- BIANKIN, A. V.; WADDELL, N.; KASSAHN, K. S.; GINGRAS, M-C.; MUTHUSWAMY, L. B.; JOHNS, A. L. et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. **Nature**, 491:399–405. 2012.
- BLACKFORD, A.; SERRANO, O. K.; WOLFGANG, C. L.; PARMIGIANI, G.; JONES, S.; ZHANG, X. et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. **Clin Cancer Res**, 15:4674–9. 2009.
- BOJAROVÁ, P.; KŘEN, V. Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives. **Biomater. Sci**, 2016.
- BOSETTI, C.; LUCENTEFORTE, E.; SILVERMAN, D. T.; PETERSEN, G.; BRACCI, P. M.; JI, B. T.; NEGRI, E.; LI, D.; RISCH, H. A.; OLSON, S. H.; GALLINGER, S.; MILLER, A. B.; BUENO-DE MESQUITA, H. B. ; TALAMINI, R.; POLESEL, J.; GHADIRIAN, P.; BAGHURST, P.A.; ZATONSKI, W.; FONTHAM, E.; BAMLET, W. R.; HOLLY, E. A.; BERTUCCIO, P.; GAO, Y. T.; HASSAN, M.; YU, H.; KURTZ, R. C.; COTTERCHIO, M.; SU, J.; MAISONNEUVE, P.; DUELL, E. J.; BOFFETTA, P.; LA VECCHIA, C.; Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). **Ann Oncol**, 23:1880–1888. 2012.
- BRISTOW, R. G.; HILL, R. P. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. **Nat Rev Cancer**, 8:180e92. 2008.
- CAMPION, C. G.; LABRIE, M.; LAVOIE, G.; ST-PIERRE, Y.; Expression of Galectin-7 Is Induced in Breast Cancer Cells by Mutant p53. **PLOS one**, 2013.
- CAPURSO, G.; SIGNORETTI, M.; VALENTE, R.; ARNELO, U.; LOHR, M.; POLEY, J.; FAVE, G. D.; CHIARO, M. D. Methods and outcomes of screening for pancreatic adenocarcinoma in high-risk individuals. **World J Gastrointest Endosc**, 7(9): 833-842. 2015.
- 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.
- CHAND, S. et al. The landscape of pancreatic cancer therapeutic resistance mechanisms. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 3, p. 273–283, 2016.
- CID-ARREGUI, A.; JUAREZ, V.; Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. **World J Gastroenterol**, 21(31): 9297-9316. 2015.
- DEL CHIARO, M. et al. Early detection and prevention of pancreatic cancer: Is it really possible today? **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 34, p. 12118–12131, 2014.
- DEMERSA, M.; COUILLARDA, J.; GIGLIA-MARIC, G.; MAGNALDOB, T.; ST-PIERREA, 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.
- Differential stimulation of VEGF-C production by adhesion/growth-regulatory galectins and plant lectins in human breast cancer cells. **Anticancer Res**, 30:4829–4833. 2010.

- DOKTOROVA, H.; HRABETA, J.; KHALIL, M. A.; ECKSCHLAGER, T. Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: the role of not only HIF-1. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, 159:166e77. 2015.
- DUELL, E. J.; LUCENTEFORTE, E.; OLSON, S. H. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, 23:2964–2970. 2012.
- DUONG, H.; YI, Y. W.; KANG, H. J.; BAE, I.; JANG, Y.; KWAK, S. J.; SEONG, Y.; Combination of dasatinib and gemcitabine reduces the ALDH1A1 expression and the proliferation of gemcitabine-resistant pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells. **International Journal of Oncology**, 44: 2132-2138, 2014.
- DUONG, H.; YI, Y. W.; KANG, H. J.; BAE, I.; JANG, Y.; KWAK, S. J.; SEONG, Y.; Combination of dasatinib and gemcitabine reduces the ALDH1A1 expression and the proliferation of gemcitabine-resistant pancreatic cancer MIA PaCa-2 cells. **International Journal of Oncology**, 44: 2132-2138, 2014.
- ERKAN, M.; ADLER, G.; APTE, M. V.; BACHEM, M. G.; BUCHHOLZ, M.; DETLEFSEN, S.; ESPOSITO, I.; FRIESS, H.; GRESS, T. M.; HABISCH, H. J.; HWANG, R. F.; JASTER, R.; KLEEFF, J.; KLOPPPEL, G.; KORDES, C.; LOGSDON, C. D.; MASAMUNE, A.; MICHALSKI, C. W.; OH, J.; PHILLIPS, P. A.; PINZANI, M.; REISER-ERKAN, C.; TSUKAMOTO, H.; WILSON, J. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. **Gut**, 61:172–178. 2012.
- ERKAN, M.; KURTOGLU, M.; KLEEFF, J. The role of hypoxia in pancreatic cancer: a FEIG, C.; GOPINATHAN, A.; NEESSE, A.; CHAN, D. S.; COOK, N.; TUVESON, D. A. The pancreas cancer microenvironment. **Clin Cancer Res**, 18:4266–4276. 2012.
- FERDEK, P. E.; JAKUBOWSKA, M. A. Biology of pancreatic stellate cells—more than just pancreatic cancer. **Pflugers Arch - Eur J Physiol**, 2017.
- FERRONE, C. R.; LEVINE, D. A.; TANG, L. H. BRCA germline mutations in Jewish patients with pancreatic adenocarcinoma. **J Clin Oncol**, 27:433–438. 2009.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiol Rev**, 88:125–172. 2008.
- FUJITA, K.; IWAMA, H.; OURA, K.; TADOKORO, T.; SAMUKAWA, E.; SAKAMOTO, T.; NOMURA, T.; TANI, J.; YONEYAMA, H.; MORISHITA, A.; HIMOTO, T.; HIRASHIMA, M.; MASAKI, T. Cancer Therapy Due to Apoptosis: Galectin-9. **Int. J. Mol. Sci**, 18, 74. 2017.
- GHIORZO, P.; GARGIULO, S.; NASTI, S. Predicting the risk of pancreatic cancer: on CDKN2A mutations in the melanoma-pancreatic cancer syndrome in Italy. **J Clin Oncol**, 25:5336–5337. 2007.
- GUPTA, G. S. Animal lectins: form, function and clinical applications. **Springer-Verlag, Wien**, 2012.
- HABERLAND, J.; BERTZ, J.; WOLF, U. German cancer statistics 2004. **BMC Cancer**, 10: 52. 2010.
- HEUSSCHEN, R.; GRIFFIOEN, A. W.; THIJSSSEN, V. L. Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades. **Biochim. Biophys. Acta**, 1836 177–185. 2013.
- HRUBAN, R. H.; PITMAN, M. B.; KLIMSTRA, D. S. Atlas of tumor pathology: Tumors of the pancreas. **American Registry of Pathology and Armed Forces Institute of Pathology**, Vol. 4, No 6. 2007.
- 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.

- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J Clin**, 60: 277–300. 2010.
- JOHN, S.; MISHRA, R. Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. **J. Biosci**, 41(3) 507–534. 2016.
- JONES, S.; ZHANG, X.; PARSONS, D. W.; LIN, J. C-H.; LEARY, R. J.; ANGENENDT, P. et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. **Science**, 321:1801–6. 2008.
- KALTNER, H.; TOEGEL, S.; CABALLERO, G.G.; MANNING, J.C.; LEDEEN, R.W.; GABIUS, H. J. Galectins: their network and roles in immunity/tumor growth control. **Histochem Cell Biol**, 147:239–256. 2017.
- KAMILI, N.A.; ARTHUR, C. M.; GERNER-SMIDT, C.; TAFESSE, E.; BLENDIA, A.; DIAS-BARUFFI, M.; STOWELL, S. R. Key regulators of galectin–glycan interactions. **Proteomics**, 16, 3111–3125. 2016.
- KAUR, M.; KAUR, T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. Roles of Galectin-7 in Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, 17 (2), 455-461. 2016.
- 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**, 4(9):1461-71. 2013.
- 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.
- KLEGER, A.; PERKHOFER, L.; SEUFFERLEIN, T. Smarter drugs emerging in pancreatic cancer therapy. **Annals of Oncology**, 25: 1260–1270, 2014.
- KOONG, A. C.; MEHTA, V. K.; LE, Q. T; FISHER, G. A.; TERRIS, D. J.; BROWN, J. M.; BASTIDAS, A. J.; VIERRA, M. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys**, 48(4): 919-922, 2000.
- KOORSTRA, J. B. M. et al. Morphogenesis of pancreatic cancer: Role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 393, n. 4, p. 561–570, 2008.
- KOSMIDIS, C. et al. Pancreatic cancer from bench to bedside: molecular pathways and treatment options. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 9, 2016.
- LABRIE, M.; VLADOIU, M. C.; GROSSET, A. A.; GABOURY, L.; ST-PIERRE Y.; Expression and functions of galectin-7 in ovarian cancer. **Oncotarget**, Vol. 5, No. 17. 2014.
- LABRIE, M.; VLADOIU, M.; LECLERC, B. G.; GROSSET, A-A.; , GABOURY, L.; STAGG, J.; ST-PIERRE, Y. A Mutation in the Carbohydrate Recognition Domain Drives a Phenotypic Switch in the Role of Galectin-7 in Prostate Cancer. **PLoS ONE**, 10(7): e0131307. 2015.
- LI, N. et al. Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) Recruits Macrophage to Activate Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 799, 2016.
- LIU, Y.; DU, L.; Role of pancreatic stellate cells and periostin in pancreatic cancer progression. **Tumor Biol**, 36:3171–3177. 2015.
- LOGSDON, D. P. et al. Regulation of HIF1 α under Hypoxia by APE1 / Ref-1 Impacts CA9 Expression : Dual-Targeting in Patient- Derived 3D Pancreatic Cancer Models. **Molecular Cancer Therapy**, 2016.
- MAFTOUH, M.; BELO, A. I.; AVAN, A.; FUNEL, N.; PETERS, G. J.; GIOVANNETTI, E.; VAN DIE, I. Galectin-4 expression is associated with reduced lymph node metastasis and modulation of Wnt/ β -catenin signalling in pancreatic adenocarcinoma. **Oncotarget**, Vol. 5, No. 14. 2014.

- MASAMUNE, A.; KIKUTA, K.; WATANABE, T.; SATOH, K.; HIROTA, M.; SHIMOSEGAWA, T. Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 295: G709e17. 2008.
- MASAMUNE, A.; WATANABE, T.; KIKUTA, K.; SHIMOSEGAWA, T. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 7:S48–S54. 2009.
- MENDEZ-HUERGO, S. P.; BLIDNER, A. G.; RABINOVICH, G. A. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. **Current Opinion in Immunology**, 45:8–15. 2017.
- MILLER, K. D.; SIEGEL, R. L.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; KRAMER, J. L.; ROWLAND, J. H.; STEIN, K. D.; ALTERI, R.; AHMEDIN JEMAL, D. V. M. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016. **CA CANCER J CLIN**, 66:271–289. 2016.
- OLSON, P.; CHU, G. C.; PERRY, S. R.; NOLAN-STEVAUX, O.; HANAHAHAN, D. Imaging guided trials of the angiogenesis inhibitor sunitinib in mouse models predict efficacy in pancreatic neuroendocrine but not ductal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.**, 108:E1275e84. 2011.
- potential therapeutic target?. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, 1747-4132. 2015.
- ROMBOUTS, S. J. et al. Systematic Review of Resection Rates and Clinical Outcomes After FOLFIRINOX-Based Treatment in Patients with Locally Advanced Pancreatic Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, 2016.
- ROSSI, M. L.; REHMAN, A. A.; GONDI, C. S.; Therapeutic options for the management of pancreatic cancer. **World J Gastroenterol**, 20(32): 11142-11159. 2014.
- RUBINSON, D. A.; WOLPIN, B. M.; Therapeutic Approaches for Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v 29, p 761–776. 2015.
- RUBINSON, D. A.; WOLPIN, B. M.; Therapeutic Approaches for Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v 29, p 761–776. 2015.
- SATO, M.; NISHI, N.; SHOJI, H. et al. Quantification of galectin-7 and its localization in adult mouse tissues. **J Biochem**, 131, 255-60. 2002.
- SAUSEN, M.; PHALLEN, J.; ADLEFF, V.; JONES, S.; LEARY, R. J.; BARRETT, M. T. et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. **Nat Commun**, 6:7686. 2015.
- SAUSSEZ, S.; KISS, R. Galectin-7. **Cell Mol Life Sci**, 63, 686-97. 2006.
- SCHNEIDERHAN, W.; DIAZ, F.; FUNDEL, M.; ZHOU, S.; SIECH, M.; HASEL, C.; MOLLER, P.; GSCHWEND, J. E.; SEUFFERLEIN, T.; GRESS, T.; ADLER, G.; BACHEM, M. G. Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. **J Cell Sci**, 120: 512–519. 2007.
- SHIELDS, M. A.; DANGI-GARIMELLA, S.; REDIG, A. J.; MUNSHI, H. G. Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. **Biochem J**, 441:541–552. 2012.
- SLATER, E. P.; LANGER, P.; NIEMCZYK, E. PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. **Clin Genet**, 2010.
- STEWART, B. W.; WILD, C. **World cancer report 2014**.
- TEMPERO, M. A.; ARNOLETTI, J. P.; BEHRMAN, S.; BEN-JOSEF, E.; BENSON III, A. B.; BERLIN, J. D.; Pancreatic Adenocarcinoma: Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, 8(9): 972–1017. 2010.

- TEMPERO, M. A.; ARNOLETTI, J. P.; BEHRMAN, S.; BEN-JOSEF, E.; BENSON III, A. B.; BERLIN, J. D.; Pancreatic Adenocarcinoma: Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, 8(9): 972–1017. 2010
- TIMOSHENKO, A. V. Towards molecular mechanisms regulating the expression of galectins in cancer cells under microenvironmental stress conditions. **Cell. Mol. Life Sci**, 72:4327–4340. 2015.
- TIMOSHENKO, A. V.; KALTNER, H.; ANDRÉ, S.; GABIUS, H. J.; LALA, P. K. VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; FREEZE, H. H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W.; ETZLER, M. E. Essentials of Glycobiology. **Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press**, e2. 2009.
- VILLENEUVE, C.; BARICAULT, L.; CANELLE, L.; BARBOULE, N.; RACCA, C.; MONSARRAT, B.; MAGNALDO, T.; LARMINAT, F. Mitochondrial proteomic approach reveals galectin-7 as a novel BCL-2 binding protein in human cells. **Mol Biol Cell**, 22(7):999–1013. 2011.
- VINCENT, A. et al. Pancreatic cancer. **Lancet**, v. 378, n. 9791, p. 607–620, 2011.
- WADDELL, N.; PAJIC, M.; PATCH, A. M.; CHANG, D. K.; KASSAHN, K. S.; BAILEY, P. et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. **Nature**, 518:495–501. 2015.
- VONLAUFEN, A.; JOSHI, S.; QU, C.; PHILLIPS, P. A.; XU, Z.; PARKER, N. R.; TOI, C. S.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S.; GOLDSTEIN, D.; APTE, M. V. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. **Cancer Res**, 68:2085–2093. 2008.
- WELEDJI, E. P. et al. How grim is pancreatic cancer? **Oncology Reviews**, v. 10, n. 1, 2016.
- WITKIEWICZ, A. K.; MCMILLAN, E. A.; BALAJI, U.; BAEK, G.; LIN, W-C.; MANSOUR, J. et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. **Nat Commun**, 6:6744. 2015.
- 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.
- 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.
- XU, Z.; VONLAUFEN, A.; PHILLIPS, P. A.; FIALA-BEER, E.; ZHANG, X.; YANG, L.; BIANKIN, A. V.; GOLDSTEIN, D.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S.; APTE, M. V. Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. **Am J Pathol**, 177:2585–2596. 2010.
- YANG, J.; ZHU, L.; CAI, Y.; SUO, J.; JIN, J.; Role of downregulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. **International Journal of Oncology**, 45: 1313–1320, 2014.
- YU, T.; TANG, B.; SUN, X. Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. **Yonsei Med J**, 58(3):489–496. 2017.
- ZHANG, Q. et al. Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2016, 2016.
- ZHAO, L.; BURT, A. D. The diffuse stellate cell system. **J Mol Histol**, 38:53–64. 2007.

**APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA PANCREAS: JOURNAL
OF NEUROENDOCRINE TUMORS AND PANCREATIC DISEASES AND
SCIENCES**

Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Have High Serum Galectin-9 Levels:
A Sweet Molecule to Keep an Eye On

Lucas B. Tavares

Postgraduate Program in Therapeutic Innovation (PPGIT)

Bioscience Center (CB)

Federal University of Pernambuco (UFPE)

Brazil

Antônio F. S. Filho, MD

Postgraduate Program in Therapeutic Innovation (PPGIT)

Bioscience Center (CB)

Federal University of Pernambuco (UFPE)

Brazil

Mario R. Martins, MD

Cancer Hospital of Pernambuco (HCP)

Brazil

Kamila M. Vilar, MD

Postgraduate Program in Therapeutic Innovation (PPGIT)

Bioscience Center (CB)

Federal University of Pernambuco (UFPE)

Brazil

Maira G. R. Pitta, MD, PhD

Biochemistry Department

Bioscience Center (CB)

Federal University of Pernambuco (UFPE)

Brazil

Moacyr J. B. M. Rêgo, MD, PhD

Biochemistry Department

Bioscience Center (CB)

Federal University of Pernambuco (UFPE)

Brazil

Abstract: We present an evaluation of serum and tissue Gal-9 expression in diagnosed pancreatic adenocarcinoma patients. PADC (n=34) Gal-9 serum levels were quantified by ELISA. Immunostaining reactions were performed to detect Gal-9 in PDAC (n=16) tissue samples. We have presented a high expression of Gal-9 in pancreatic cancer serum and tissue. Moreover, we suggest that Gal-9 overexpression in PDAC comes from different survival mechanisms in the tumor microenvironment.

GALECTIN-9 IN PANCREATIC ADENOCARCINOMA

Pancreatic adenocarcinoma (PADC) is characterized by poor prognosis due to delayed diagnosis and aggressive behaviour.¹ While some solid tumors, such as breast cancer, presents the survival rate at 90%, PADC is the one of mainly types of cancer with a rising mortality rate, with a 5-year relative survival rate about 9%. Therefore, early diagnosis is the most important factor for improving prognosis.²

Galectins are a part of the lectin family and perform their main biological functions by interacting with specific glycoconjugates: β -galactosides carbohydrate structures linked to proteins, peptides and lipids.³ Galectin-9 (Gal-9) is a tandem-repeat type galectin with two carbohydrate-recognition domains. Studies revealed that Gal-9 modulates a variety of biological functions including apoptosis, aggregation and adhesion of tumor cells. Galectin-9 also participates from different tumor progression and altered galectin expression has diagnostic or prognostic value in different types of cancer, like in gastric and colon cancers.⁴

We present an evaluation of serum and tissue Gal-9 expression in diagnosed pancreatic adenocarcinoma patients.

MATERIALS AND METHODS

Blood samples were collected from 34 patients with confirmed diagnostic of PDAC, after ethical committee board approval. PADC Gal-9 serum levels were quantified by ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) sandwich, following the suppliers information (R & D Systems). None of the patients had received any anticancer therapy prior sample collection. Also, formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) PADC

specimens were retrieved from the archives of the Department of Pathology, Hospital of Cancer, Pernambuco - Brazil (HCP).

Immunostaining reactions were performed to detect Gal-9. Deparaffinated sections were incubated with primary antibody rabbit polyclonal anti-galectin-9 (1:50) for 2 hrs. Gastric tissue was used as a positive control and in negative control the primary antibody was replaced with non-specific IgG in a PBS/BSA 1% solution. Each section image was captured using Eclipse Ts2 microscope (Nikon).

RESULTS

PADC (n = 34) and control volunteers (n = 66) were paired by sex (p = 0.11130) and age (p = 0.1205). Females represents 71% of PADC cases and 81% of control volunteers. The median age of control group and PDAC group were 62 and 64 years, respectively. All 34 sera from PADC patients were Gal-9 positive, demonstrating a significant high level [6862(12000-1802)] than controls [46,88(3883-46,87)] (Figure 1A). To investigate which possible sources production of Gal-9, we performed an immunostaining reaction using FFPE pancreatic adenocarcinoma. Histologically, Gal-9 staining was positive in all excepted one cases analyzed. Tumor cells presented homogeneous cytoplasmic staining with positive stroma also. Gal-9 was present in endothelial structures, blood vessels and inflammatory cells (Figure 1B).

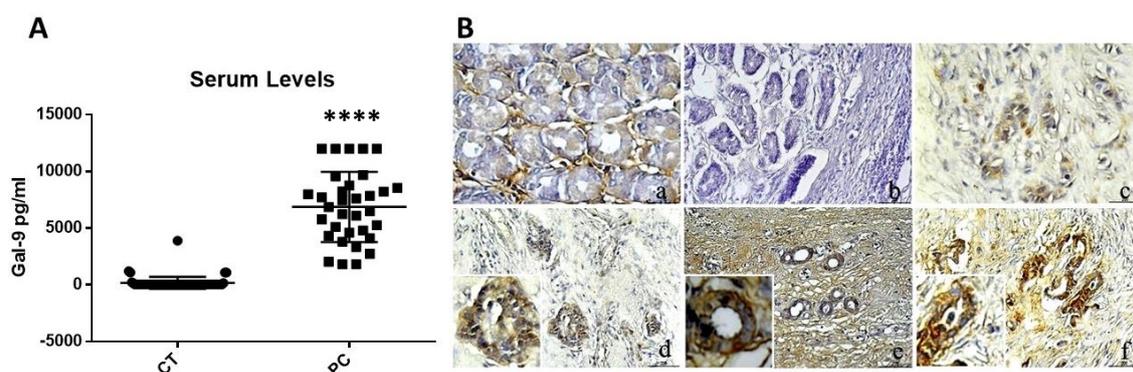


FIGURE 1. A, Serum levels of Gal-9 in the serum of healthy volunteers and diagnosed with pancreatic cancer. (**** = p < 0.0001). CT= control sera from healthy volunteers. PC= pancreatic cancer sera. **B**, Immunohistochemical evaluation of Gal-9 in tissue samples from pancreatic tumors, performed by. a. gastric tissue as a positive control to Gal-9. b. gastric tissue as a negative control. Gal-9 staining was observed in the cytoplasm (c, d, f) and stroma (e).

DISCUSSION

Until our knowledge, this is the first evaluation study of Gal-9 serum levels in PDAC patients. According to our data, Gal-9 presents a remarkable expression in both serum and tissue pancreatic cancer patients cases. To date, the role of gal-9 in PDAC is

not fully understood and the literature reports dual functions. Gal-9 overexpression is associated with its capacity to promote a tolerogenic macrophage, programming an adaptive immune suppression, binding to Dectin 1 receptor in tumor macrophages.⁵ However, Gal-9 is also associated with antitumor effects by suppressing cell proliferation and inducing intrinsic apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways.⁶

CONCLUSIONS

We have presented a high expression of Gal-9 in pancreatic cancer serum and tissue. Moreover, we suggest that Gal-9 overexpression in PDAC comes from different survival mechanisms in the tumor microenvironment.

REFERENCES

- Daley D, Mani VR, Mohan N, et al. Dectin 1 activation on macrophages by galectin 9 promotes pancreatic carcinoma and peritumoral immune tolerance. *Nat Med.* 2017 May;23(5):556-567.
- Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(44):9694–705.
- Kenner BJ, Go VLW, Chari ST, et al. Early Detection of Pancreatic Cancer: The Role of Industry in the Development of Biomarkers. *Pancreas*: November/December 2017 - Volume 46 - Issue 10 - p 1238–1241.
- Okura R, Fujihara S, Iwama H, et al. MicroRNA profiles during galectin-9-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Oncol Lett.* 2018 Jan; 15(1): 407–414.
- Punt S, Thijssen VL, Vrolijk J, et al. Galectin-1, -3 and -9 Expression and Clinical Significance in Squamous Cervical Cancer. *PLoS ONE.* 2015;10(6): e0129119.
- Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2015; 1855: 235–247.