

Avaliação da expressão diferencial da galectina-12 em câncer de pâncreas

Evaluation of the differential expression of galectin-12 in pancreas cancer

DOI:10.34117/bjdv7n10-336

Recebimento dos originais: 07/09/2021

Aceitação para publicação: 25/10/2021

Pedro Marcos da Costa Oliveira

Curso de Bacharelado em Medicina (em andamento)

Instituição: UPE – Universidade de Pernambuco *campus* Garanhuns

Endereço: Rua Paulo Afonso, 60, apt 303, Bairro São José, Garanhuns-PE, CEP: 55295-153

E-mail: pedromarcosco@gmail.com

Luiza Rayanna Amorim de Lima

Doutora em Biologia Aplicada à Saúde

Instituição: UPE – Universidade de Pernambuco *campus* Garanhuns

Endereço: Rua Capitão Pedro Rodrigues, 105, Bairro São José, Garanhuns-PE, CEP: 55294-902

E-mail: luiza.amorim@upe.br

RESUMO

Sabe-se que Câncer de Pâncreas (CP) é responsável por cerca de 2% de todos os tipos de câncer diagnosticados e responde por 4% do total de mortes por essa doença. Este tipo de tumor é difícil detecção e, portanto, alta taxa de mortalidade, por conta do diagnóstico tardio e de seu comportamento agressivo. Vários fatores de risco estão relacionados ao câncer de pâncreas, tais como, obesidade, alimentação, como excesso de gordura, bem como o acúmulo de gordura corporal, diabetes mellitus, erros genéticos e o tabagismo. Existe um motivo comum que pode explicar o câncer de pâncreas, quando correlacionado aos fatores de risco, que é a resistência à insulina. Diante desses fatores de risco citados, o alvo desse estudo é a galectina-12 (GAL-12), membro da família das lectinas, a qual é preferencialmente expressa em adipócitos e tem papel regulador na degradação lipídica (lipólise). Tal fato sugere que a galectina-12 pode ser um alvo útil para o tratamento de condições metabólicas como a resistência à insulina, a qual está diretamente relacionada ao aparecimento de câncer pancreático. Além disso, esta lectina (Galectina-12) é responsável por promover a adesão mediada pela integrina, como também pela manutenção do ciclo celular na fase G1 e pelo apoptose em células neoplásicas.

Portanto, esta proposta teve como objetivo analisar o perfil de expressão de Galectina-12 em tumores de pâncreas, avaliando as variações de expressão que tendem a ser relevantes no diagnóstico e prognóstico do carcinoma e do adenocarcinoma pancreáticos. Foram utilizados blocos de biópsias de tumores pancreáticos para realização da análise do perfil de expressão de Gal-12 por imuno-histoquímica. A análise morfológica foi realizada utilizando o sistema integrado de análise de imagens.

Ao analisarmos apenas os pacientes cujas lâminas continham tecido canceroso, em uma estimativa ap'roximada, 88,9% deles expressaram a Galectina-12 no câncer de pâncreas.

Este trabalho contribuiu, assim, para melhor compreender o papel da Galectina-12 no Adenocarcinoma e Carcinoma pancreático, bem como a interação dessa galectina com a tumorigênese em geral. Observando as expressões dela através da imuno-histoquímica na região apical, citoplasmática e no estroma nos tumores pancreáticos estudados.

Palavras-chave: adenocarcinoma pancreático, galectina-12 glicobiologia, imunohistoquímica.

ABSTRACT

It is known that Pancreatic Cancer (PC) is responsible for about 2% of all types of cancer diagnosed and accounts for 4% of all deaths from this disease. This type of tumor is difficult to detect and, therefore, has a high mortality rate, due to its late diagnosis and aggressive behavior. Several risk factors are related to pancreatic cancer, such as obesity, diet, excess fat, as well as body fat accumulation, diabetes mellitus, genetic errors and smoking. There is a common reason that can explain pancreatic cancer, when correlated to risk factors, which is insulin resistance. Given these risk factors, the target of this study is galectin-12 (GAL-12), a member of the lectin family, which is preferentially expressed in adipocytes and has a regulatory role in lipid degradation (lipolysis). This fact suggests that galectin-12 may be a useful target for the treatment of metabolic conditions such as insulin resistance, which is directly related to the onset of pancreatic cancer. Furthermore, this lectin (Galectin-12) is responsible for promoting integrin-mediated adhesion, as well as for maintaining the cell cycle in the G1 phase and for apoptosis in neoplastic cells.

Therefore, this proposal aimed to analyze the expression profile of Galectin-12 in pancreatic tumors, evaluating expression variations that tend to be relevant in the diagnosis and prognosis of pancreatic carcinoma and adenocarcinoma. Blocks of pancreatic tumor biopsies were used to analyze the Gal-12 expression profile by immunohistochemistry. Morphological analysis was performed using the integrated image analysis system.

When analyzing only patients whose slides contained cancerous tissue, in a rough estimate, 88.9% of them expressed Galectin-12 in pancreatic cancer.

This work thus contributed to a better understanding of the role of Galectin-12 in Adenocarcinoma and Pancreatic Carcinoma, as well as the interaction of this galectin with tumorigenesis in general. Observing its expression through immunohistochemistry in the apical, cytoplasmic and stroma regions of the studied pancreatic tumors.

Keywords: pancreatic adenocarcinoma, galectin-12 glycobiology, immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que Câncer de Pâncreas (CP) apresentou cerca de 340 mil novos casos nos últimos anos. É responsável por cerca de 2% de todos os tipos de câncer diagnosticados e responde por 4% do total de mortes por essa doença. Este tipo de tumor é de difícil detecção e, portanto, alta taxa de mortalidade, devido ao diagnóstico tardio e ao seu comportamento agressivo. O aumento da quantidade de pacientes com CP é justificada entre outros fatores pelo caráter silencioso dos sintomas iniciais desta doença (INCA, 2016).

Carcinomas e adenocarcinomas de pâncreas são caracterizados pelo fenótipo altamente maligno, com rápida progressão, metástase antecipadas e uma resposta limitada à rádio e quimioterapia (HAMADA, et al., 2012). Enquanto o índice de morte relacionado aos tumores mais incidentes como mama ou cólon tem diminuído nas últimas duas décadas, poucos avanços são registrados para o câncer pancreático (LI, et al., 2010). A abundante reação estromal/desmoplásica é um dos fatores clássicos que permeiam o desenvolvimento deste tipo de tumor, de modo que em muitos casos, o tecido desmoplásico chega a ocupar 70% da massa tumoral (TJOMSLAND, et al., 2011). Evidências recentes apontam para uma conexão entre as células neoplásicas e o estroma, o qual suporta o crescimento tumoral através de vascularização e recrutamento de células inflamatórias. Além desse fator, outros que estão relacionados ao câncer de pâncreas são a obesidade, alimentação, excesso de gordura, diabetes mellitus, erros genéticos e o tabagismo. Existe um fator comum que pode explicar o câncer de pâncreas, quando correlacionado aos fatores de risco, que é a resistência à insulina (MOLENA-FERNANDES, et al., 2005).

Diante desses fatores de risco supracitados, a galectina-12 (GAL, um membro da família das lectinas de galectina, é preferencialmente expressa em adipócitos). Esta galectina está localizada em gotículas lipídicas (vacúolos lipídicos), organelas especializadas para armazenamento de gordura. A galectina-12 regula a degradação lipídica (lipólise) através da modulação da sinalização da proteína quinase lipolítica A (PKA). Quando há deficiência em galectina-12 exibe-se lipólise de adipócitos aumentada, aumento da respiração mitocondrial, redução da adiposidade e melhora na resistência à insulina associada ao ganho de peso. Tais fatos sugerem que a galectina-12 pode ser um alvo útil para o tratamento de condições metabólicas relacionadas à obesidade, como resistência à insulina, síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2, que como já citado, o último, está diretamente correlacionado ao aparecimento de câncer pancreático (YANG, 2012).

As Galectinas, de uma forma geral, além das funções metabólicas, podem promover e inibir a adesão mediada pela integrina. Para melhorar a adesão mediada por integrinas, que são proteínas transmembrana heterodiméricas, pertencentes ao grupo de moléculas de adesão celular, as Galectinas funcionam como agente de ligação cruzada ou crosslinking entre dois glicanos (glicolipídeos ou glicoproteínas), em diferentes células, processo em que moléculas lineares formam polímeros tridimensionais com massa molar elevada, tornando a estrutura mais rígida. Com isso, além de ser conferida uma maior

estabilidade natural para a ligação, aproxima as células de modo que a ligação à integrina ocorra. Eles também podem impedir a adesão ligando-se a dois glicanos na mesma célula, o que bloqueia o sítio de ligação da integrina, tendo papel direto no processo de infiltração tumoral – metástase (THURSTON, 2012). Além disso, a Galectina-12, especificamente, já foi estudada anteriormente e mostrou papel importante em prender o ciclo celular na fase G1 quando expresso ectopicamente em algumas células cancerosas e também para induzir a apoptose em outras (YANG, 2012).

Portanto, visto a influência no metabolismo dos lipídeos, na adesão celular e na divisão celular, o estudo da expressão desta Galectina permite a descoberta de novos marcadores biológicos, com potencial para alvos terapêuticos, o aperfeiçoamento do diagnóstico e otimização das estratégias terapêuticas.

Esta proposta tem como objetivo analisar o perfil de expressão de Galectina-12 em tumores de pâncreas, avaliando as variações imuno-histoquímicas que tendem a ser relevantes no diagnóstico e prognóstico do carcinoma e do adenocarcinoma pancreáticos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Analisar o perfil de expressão de Galectina-12 em câncer de pâncreas avaliando as variações que tendem a ser relevantes no diagnóstico e prognóstico de tumores pancreáticos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a Galectina-12 diferencialmente expressa em amostras de tumores pancreáticos através de imuno-histoquímica;
- Correlacionar a expressão de Galectina-12 por imuno-histoquímica com os dados clínicos da doença;
- Correlacionar a expressão da Galectina com os parâmetros de Sobrevida (Sobrevida Global, Sobrevida Livre da Doença e sobrevida livre de metástases).

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA DO MATERIAL

Trata-se de um estudo observacional, analítico e de caráter retrospectivo das amostras de tecidos dos carcinomas e adenocarcinomas de pâncreas, colhidas do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Pernambuco – HCP. Foram selecionados quinze pacientes com os tumores, diagnosticados entre o período de 2013 a 2018. Todas as amostras foram fixadas em formalina tamponada e emblocadas em parafina.

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram realizados cortes de 4 µm a partir de blocos de parafina de Carcinomas e adenocarcinomas de pâncreas (N=15). Os mesmos foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (100% e 70%). Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato 100mM, pH 6.0 em microondas 300 W de potência por 15 min. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas em solução com metanol-H₂O₂ 0,3% (v/v) por 30 min, a 25°C, seguida de solução de BSA-PBS 1% (p/v) por 30 min a 25°C. Os cortes histológicos incubados com o anticorpo primário anti-LGALS12 diluídos em PBS-BSA 1% (p/v) por 18 h a 4°C. O excesso do anticorpo foi retirado com dois banhos do tampão PBS e em seguida, incubados com o sistema de revelação de polímero livre de biotina (DAKO) e revelados com DAB-H₂O₂. Os controles positivos foram utilizados segundo indicação do fabricante de anticorpo e para controle negativo o anticorpo foi substituído por IgG humana (DAKO).

3.3 ANÁLISE DE IMAGENS

Para a análise morfológica foi utilizado o sistema integrado de análise de imagens BIOPTICA B20 que utiliza software ISCapture e câmera monocromática altamente sensível CMOS (resolução de 2584 x 1936 pixels) disponível no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas- LINAT. A análise semi-quantitativa das células marcadas foi realizada analisando três campos aleatórios em cada caso. Foi realizada a exclusão de 3 amostras (cujos tecidos apresentam artefatos de autólise ou sinais de processamento inadequado).

3.4 ASPECTOS ÉTICOS

Esta proposta faz parte do projeto da docente Luiza Rayanna Amorim de Lima, intitulado “Avaliação da expressão diferencial de glicosiltransferases, metaloproteinases e TIMPs em câncer de pâncreas”. O mesmo é contemplado pelo trabalho “Análise de novos biomarcadores para câncer de pâncreas”, o qual foi analisado e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP (CAAE: 44002815.2.1001.5205), sob responsabilidade do pesquisador Mario Rino Martins, cirurgião oncológico do HCP-PE.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Enquanto galectinas são capazes de exercer várias atividades *in vivo* e *in vitro*, envolvendo glicanos da superfície celular, tornou-se cada vez mais claro que pode regular as respostas celulares, como processos apoptóticos e na adesão celular, funcionando intracelularmente e no estroma. Cada tipo de galectina, tem sua especificidade de ação e seu local de produção, bem como a forma de se expressar. Até então, com os estudos mais recentes, foi possível observar que a Galectina-12 é uma lectina intracelular, essencialmente, também não observou-se a presença da proteína propriamente dita, mas sim apenas o RNA, diante de tais estudos apresentados e analisados, esta foi observada e é expressa na membrana dos vacúolos lipídicos, também expressa em leucócitos humanos, especialmente as células mielóides (células primárias da hematopoese), também nas glândulas sebáceas da pele e no couro cabeludo (HARRISON, 2007).

O tecido adiposo, em si, libera entre outras substâncias peptídeos hormonais como leptina, adiponectina, que podem estimular a angiogênese e aumentar a expressão das metaloproteinases. Ele também libera resistina, citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6) e fator transformador de crescimento b (TGF- β). O aumento da liberação de ácidos graxos livres, resistina, TNF α , IL-6 pelo tecido adiposo e a redução da liberação de adiponectina dão origem a resistência à insulina (FONSECA, 2010). Como a captação de glicose pelos tecidos diminui, o pâncreas passa a secretar mais insulina. Essa hiperinsulinemia pode gerar o câncer de pâncreas, devido ao estado de hiperfunção induzida. Tendo isso em mente, além da hiperinsulinemia ser um agente causador direto de tumor no pâncreas, o excesso da insulina promove o crescimento do tumor por estimular o aumento do IGF-1 (fator que estimula o crescimento celular, assim como a insulina) e também é graças a ele que aumenta a síntese de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) podendo causar a angiogênese. Geralmente alguns fatores agravam essa condição de hiperinsulinemia,

como dieta desbalanceada, hiperlipídica e hiperglicídica, sedentarismo, ademais, geralmente esses pacientes são obesos e a quantidade de gordura corporal é proporcional ao grau de resistência à insulina. Outrossim, na obesidade são gerados vários tipos de radicais livres que podem danificar o DNA gerando uma mutação, podendo assim causar o aparecimento ou agravamento de neoplasias (XAVIER, 2008).

Diante dos estudos sobre o tema, observou-se que os estudos da Galectina-12 são limitados e muito recentes, não havendo nenhum trabalho referente ao estudo da Galectina-12 atrelado ao aparecimento de neoplasias. Entretanto, o início do processo de formação do tumor de pâncreas parte de alguns princípios nos quais nos chama a atenção para o envolvimento dessa Galectina e sobre sua possível expressão, tanto de forma intracelular quanto da secreção no estroma dos tecidos. Partindo do princípio de que a Galectina-12 é pertencente à família das galactinas, que são lectinas (classe de proteínas de origem não-imunológica, que podem aglutinar hemácias graças à sua propriedade de se ligar reversivelmente a carboidratos), tal Galactina, terá grande papel na promoção e na inibição da adesão mediada pela integrina que, teoricamente, em sua ausência, abre parâmetro para disseminação do crescimento tumoral, visto que as invasões e disseminações tumorais estão baseadas na resistência dos tecidos. Os planos de menor resistência tecidual, como tecidos moles ou frouxos, bem como os tecidos desestruturados por quebra nas adesões celulares, constituem uma dessas vias (WARD, 2002).

É importantíssimo salientar que algumas outras características para expressão tumoral no câncer de pâncreas foram analisadas para abordagem da Galectina em questão para ser estudada nesse trabalho. A Galectina-12, mostra papel importante em prender o ciclo celular na fase G1 quando expresso ectopicamente em algumas células cancerosas e também para induzir a apoptose em outras (YANG, 2012). Nas fases G1 (principalmente) e S existem diversos mecanismos reguladores afetam multiplicação celular. Os fatores de crescimento, produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (“feedback”) são inibidores da multiplicação celular. Estes controles são genes supressores tumorais, que neste caso, detém a replicação celular quando há dano no DNA, para que este seja reparado. Se uma célula fica estática na fase G1, esses oncogenes podem se alterar, deixando assim de funcionar normalmente, transformando a célula alvo em uma célula cancerosa. A Galectina-12, também afeta, como já dito, a replicação celular, entretanto seus mecanismos são obscuros (bem como a grande maioria dos outros mecanismos). Outro mecanismo regulador é a apoptose – morte celular programada, que provoca a morte da

célula em detrimento da possibilidade de a célula tornar-se alterada, porém isso causa diminuição da resistência tecidual, o que é extremamente agravante para o aparecimento de câncer, como já foi citado (ALMEIDA, 2005).

No trabalho foram feitos testes de controle positivo para averiguar a concentração dos anticorpos e seguindo a bula do anticorpo, foi feito o controle positivo em tecido adiposo e o controle negativo foi testado diretamente em uma lâmina de um tumor pancreático (Figura 1).

A Galectina-12 foi expressa em exatos 50% dos pacientes analisados, apresentando marcação citoplasmática – sendo obtido um score médio de 4,18 (com 6 pacientes) por campos aleatórios, marcação heterogênea citoplasmática apical – score médio de 2,4 (com 1 paciente) por campos aleatórios (Figura 2A), e citoplasmática e estromal (Figura 2B) – score médio de 3,6 (com 1 paciente) por campos aleatórios. Por mais que tenham sido analisadas apenas 16 lâminas dos pacientes com carcinoma e adenocarcinoma, a porcentagem de expressões foi circunstancial, pois em 18,75% das lâminas, aparentemente o tecido caiu da lâmina e não foi passível analisar nada, em 12,5% os cortes não possuíam área representativa de tumor, em 6,25% o tecido tumoral estava todo autolisado, e apenas em outros 6,25% (configurando apenas 1 paciente) deu negativo. Contudo, se analisarmos apenas os pacientes cujas lâminas continham tecido canceroso, em uma estimativa aproximada, 88,9% deles expressaram a Galectina-12. Dessa forma, é necessária a realização de mais estudos para a obtenção de uma fidedignidade da grande expressão apresentada neste estudo, chegando assim a dados mais conclusivos.

Figura 1: Avaliação da expressão de Galectina-12 em carcinomas e adenocarcinomas pancreáticos por imunohistoquímica. (A) controle positivo; (B) controle negativo. Aumentos de 100x.

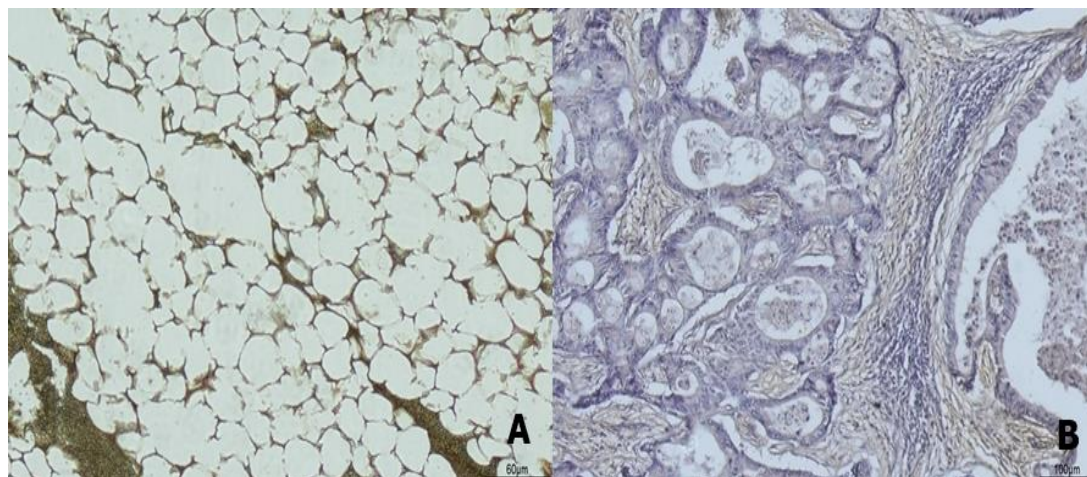
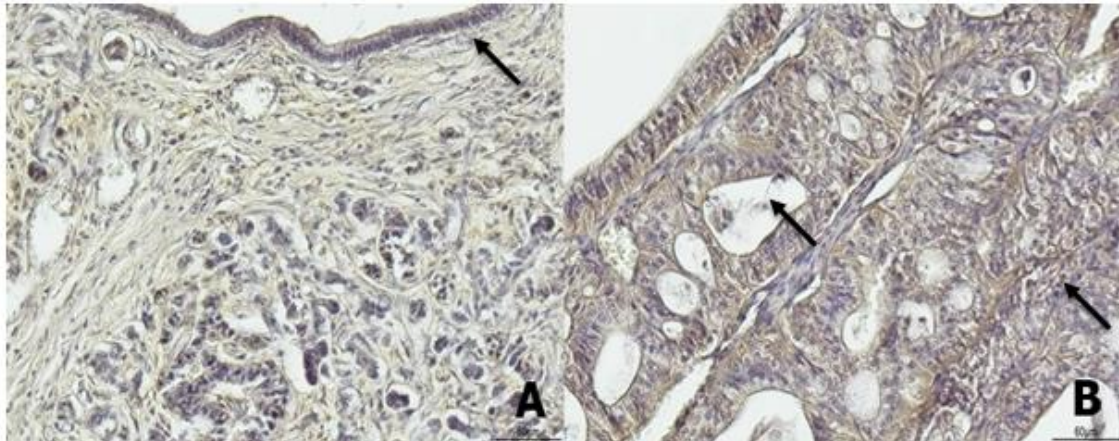


Figura 2: Localização DA Galectina-12 nos tumores de pâncreas. (A) marcação apical; (B) marcação citoplasmática e marcação estromal. Aumentos de 200x.



Com todo o trabalho desenvolvido, observou-se que a expressão da Galectina-12 nos tumores foi circunstancial. A presença da galectina-12 no processo tumoral foi constatada, no entanto, muitas questões cruciais permanecem sem resposta. As funções da galectina-12 em outros tipos de células, que não sejam os adipócitos, incluindo as tumorais, não são bem esclarecidas. Apesar do câncer de pâncreas, onde não é um sítio natural de produção dessa galectina, não se sabe ao certo quais seriam as consequências dessa expressão, se é consequência da tumorigênese ou não.

Como uma Galectina, ela tem afinidade por glicanos, mas a Galectina-12 é essencialmente intracelular (vide os resultados das amostras). Portanto, não se sabe ao certo, e não se pode concluir, como seria o mecanismo de funcionamento dessa Lectina em um espaço que não seja em tecido essencialmente adiposo.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos e a sua discussão, poder-se-á apresentar como principal conclusão deste trabalho a expressão de Galectina-12 em pacientes com Carcinoma e Adenocarcinoma pancreático.

Este trabalho contribuiu, assim, para melhor compreender o papel da Galectina-12 nestes tipos de tumores, bem como a interação dessa Galectina com a tumorigênese em geral. Observando as expressões da Galectina em questão através da imunohistoquímica na região apical, citoplasmática e no estroma nos tumores pancreáticos estudados.

Tendo estas conclusões como base, seria de grande valia dar continuidade à caracterização da expressão da Galectina-12 nestes tumores, de forma a aumentar o

conhecimento nesta área, para, assim, ser avaliada como um possível e potencial marcador diagnóstico e, futuramente, terapêutico, em pacientes com tumores pancreáticos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, VL De et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.

FONSECA, Eveline Aparecida Isquierdo. Influência da obesidade e da resistência à insulina sobre o desenvolvimento tumoral: Efeito da metformina. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

HAMADA, S.; MASAMUNE, A.; TAKIKAWA, T.; et al. Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.421, p. 349–354. 2012.

HARRISON, Wesley J. et al. Expression of lipogenic factors galectin-12, resistin, SREBP-1, and SCD in human sebaceous glands and cultured sebocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 6, p. 1309-1317, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em :<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em : 21/05/2016.

JACOB, Abitha; PREKERIS, Rytis. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Frontiers in cell and developmental biology*, v. 3, p. 4, 2015.
LI, D.; XIE, K.; WOLFF, R.; et al. Pancreatic cancer. *The Lancet*, v. 363, p. 1049–1057. 2010.

MOLENA-FERNANDES, Carlos Alexandre et al. A importância da associação de dieta e de atividade física na prevenção e controle do Diabetes mellitus tipo 2. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 27, n. 2, 2005.

THURSTON, Teresa LM et al. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature*, v. 482, n. 7385, p. 414, 2012.

TJOMSLAND, V.; SPÅNGEUS, A.; VÄLILÄ, J.; et al. Interleukin 1 α Sustains the Expression of Inflammatory Factors in Human Pancreatic Cancer Microenvironment by Targeting Cancer-Associated Fibroblasts. *Neoplasia*, v.13, p. 664–675.

WARD, Laura Sterian et al. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2002.

XAVIER, Danilo Jordão. Influência da Hiperglicemia nos Níveis de Dano no DNA e na Expressão de Genes de Defesa ao Dano Oxidativo em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

YANG, Ri-Yao; HAVEL, Peter; LIU, Fu-Tong. Galectin-12: A protein associated with lipid droplets that regulates lipid metabolism and energy balance. *Adipocyte*, v. 1, n. 2, p. 96-100, 2012.