



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA SUELY-GALDINO

JOSÉ LAURIANO DA SILVA FILHO

**EXPRESSÃO DE GALECTINA-9 E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS EM
MODELO DE NEOPLASIA GÁSTRICA**

Recife
2022

JOSÉ LAURIANO DA SILVA FILHO

**EXPRESSÃO DE GALECTINA-9 E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS EM
MODELO DE NEOPLASIA GÁSTRICA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à coordenação do curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do título
em Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Dra. Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque

Coorientadora: Msc. Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada
pelo autor, através do programa de geração
automática do SIB/UFPE

Silva Filho, José Lauriano da .

Expressão de galectina-9 e polarização de macrófagos em modelo
de neoplasia gástrica / José Lauriano da Silva Filho. - Recife, 2022.

45 : il., tab.

Orientador(a): Amanda Pinheiro de Barros
Albuquerque Coorientador(a): Maria Clara
Pinheiro Duarte Sampaio

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas
- Bacharelado, 2022.

1. Câncer gástrico. 2. Galectina-9. 3. Macrófagos associados ao
tumor. 4. Derivados de galactosídeos. I. Barros Albuquerque,
Amanda Pinheiro de. (Orientação). II. Duarte Sampaio, Maria Clara
Pinheiro . (Coorientação). III. Título.

500 CDD (22.ed.)

JOSÉ LAURIANO DA SILVA FILHO

**EXPRESSÃO DE GALECTINA-9 E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS EM
MODELO DE NEOPLASIA GÁSTRICA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à coordenação do curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do título
em Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovado em: 07/10/2022

Nota: _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Mestra Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio / UFPE

Mestra Lília Vieira Galdino / UFPE

Mestra Valécia de Cássia Mendonça da Costa / UFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me proporcionado todas essas oportunidades que tive na minha vida e vida acadêmica até agora. Por conseguinte, agradeço à UFPE por ter me cedido o espaço e o terreno necessário para que eu me desenvolvesse como aluno e como pessoa. Sou grato ao primeiro laboratório que participei, o Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA-UFPE), e, apesar de não seguir a carreira do comportamento animal, aprendi muito sobre ciência com o professor Wendel Pontes. E sou bem-agrafedecido ao meu âmbito de trabalho e de desenvolvimento acadêmico, o Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino (NUPIT-SG), donde esta labuta foi realizada, e onde pretendo continuar minha carreira acadêmica. Agradeço também a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), por ser o órgão fomentador de toda a minha pesquisa.

Na vida de qualquer ser humano, há pilares, pilares que nos sustentam em momentos difíceis, pilares que nos enaltecem quando em momentos de glória, pilares que nos ensinam a viver. Meus pilares são provindos da minha família, que sempre me deram apoio tanto nos momentos bons, como nos momentos ruins. Eu sempre tive duas pessoas como referencial de minhas bases, falo da minha mãe (Odília Vieira) e do meu pai (José Lauriano). Meus pais sempre estiveram comigo, e apesar dos pesares, sem importar a situação em que eles estavam, sempre tinham um braço para me apoiar quando assim eu precisava. Meu pai sempre foi um exemplo na minha vida, me ensinando coisas que só ele poderia ensinar, obrigado por ter me mostrado tantas coisas, meu velho, você é a referência que eu me baseei para seguir alguns ramos da minha vida, te amo. Minha mãe também sempre me ensinou coisas que só ela poderia me ensinar, sempre orando e pedindo para Deus proteção para comigo, és a pessoa que fica mais feliz com minhas conquistas, obrigado minha velha, por ser a mãe batalhadora que fosse, abdicasse de tanto em prol de minha vida, te amo. Recentemente, surgiu uma pessoa que também sustenta minha base, e está comigo em todas as horas, falo de Maria Alice, que apareceu na minha vida de um jeitinho inusitado, mas que me faz muito bem até o presente momento, te amo. Agradeço às minhas bases, pois sempre estiveram comigo, me dando apoio emocional e nos melhores momentos da minha vida.

Aos meus familiares, que sempre estiveram comigo, me dando apoio de todos os tipos, agradeço a todos. Agradeço ao meu irmão, Igor Lúcio, a sua esposa, Monike Gouveia e ao meu sobrinho, João Lúcio, por sempre comporem uma parte da minha vida. Agradeço à minha irmã, Karoline Vila, pessoa que tive oportunidade de conhecer recentemente, e já quero muito bem. Agradeço aos meus tios e tias e famílias: obrigado tia Meri Jane e Nayara Paloma; tio Normando Vieira, Socorro Silva, Abraão Vieira; tia Pollyanna Vieira, Leandro Andrade e Vitor Samuel; tia Maria de Armando, Hélder Vieira, Hênio Marques e Edirceu Oliveira; tio José de Armando; tio Cléber Vieira, Yasmin Lara e Yan Wanberg; tio João Araújo; tia Luciene Vieira, José Édson e Larissa Vieira; tia Sandra Vieira; Liliane Cavalcanti, Levi Santos, João Vittor e Júlia Vitória; Rafael Boumann. Cada um desses tios e tias, primos e primas tiveram papel fundamental no meu desenvolvimento, sou muito grato a isso.

Agradeço aos meus amigos que participaram de alguma forma de todos os meus períodos da vida, seja no ensino fundamental, seja na graduação. Agradeço a: Renato Mustafá, Davi Samuel, Nafisto Naliano e Gabriel Henrique, por serem meus amigos desde à infância. Agradeço aos meus amigos que fiz na faculdade e participaram dos perrengues da graduação: Matheus Leonydas, Gabriel José, André Otávio, Maria Viviane, Lucas Manguinho, Carla Helena, Hugo Rodrigo, Nicholas Luiz, Vitória Gabriella, Hanne Lazla e Paulo Ricardo. Vocês são amigos que pretendo levar para a vida toda, e sou muito grato por ter de alguma forma conhecido cada um de vocês.

Agradeço as pessoas que literalmente deram o sangue por mim em minha pesquisa: Minha mãe (Odília), Maria Alice, Maria Clara, Lília Galdino, Jéssica Winely, William Aoki e Nathalia Tavares. E serei eternamente grato, pois estas pessoas me doaram o sangue de bom grado, mesmo com o procedimento sendo um tanto doloroso e invasivo.

Agradeço a toda equipe do NUPIT-SG, principalmente à minha orientadora, Amanda Pinheiro, às minhas coorientadoras, Maria Clara e Lília Galdino e ao professor Moacyr Jesus. Aos colegas de equipe: Jéssica Winely, Valéria Moura, Valécia de Cássia, Anderson Félix, Auvani Antunes, Nathalia Tavares, João Victor, William Aoki, José Leandro, Vanessa Brito, Luciana, Shana Weber, Thacianna e Eraldo. Vocês participaram da minha pesquisa de alguma forma, e sou muito grato a isso, obrigado!

Gratidão é algo que cativa, com certeza há muito mais nomes que não citei aqui, entretanto, em meu coração, eu sinto gratidão por cada momento e lembro de cada pessoa. OBRIGADO!

RESUMO

O câncer gástrico (GC) está entre as neoplasias que mais matam no mundo, fato que está associado a alta capacidade metastática, elevada resistência as terapias vigentes, recidiva e poucos avanços quanto à eficácia terapêutica. A capacidade metastática do GC está associada ao seu microambiente tumoral, o qual é responsável por cooptar células do sistema imune para trabalharem em prol do câncer, e dentre elas, destacam-se os macrófagos. Quando cooptados, os macrófagos polarizam-se geralmente em macrófagos M2 e passam a secretarem substâncias pró-tumorais, que inibem o sistema imune e promovem o crescimento celular. Dentre as substâncias imunossupressoras reguladas pelos macrófagos, estão as galectinas. A galectina-9 (Gal-9) é responsável por inativar os linfócitos T, impedindo-os de reconhecerem e orquestrarem uma resposta imune anti-tumoral. Devido a essa problemática, derivados de galactosídeos são alvo de investigação, a fim de atuar como inibidores das galectinas. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de novos derivados de galactosídeos sobre linhagem de adenocarcinoma gástrico, bem como avaliar os efeitos da sinalização parácrina provinda de linhagens de neoplasia gástrica sobre a polarização de macrófagos e a expressão de Gal-9. Para tal, novos derivados de galactosídeos foram avaliados quanto a citotoxicidade, a inibição da migração de células tumorais gástricas e ao potencial inibidor da Gal-9. Os efeitos da sinalização parácrina sobre a polarização de macrófagos e o perfil de expressão da Gal-9 foram avaliados por citometria de fluxo e imunofluorescência. Os resultados revelaram os derivados GaTzLapD e GaTzLau como moléculas com potencial atividade inibidora da Gal-9 visto o perfil de interação molecular, bem como a promissora atividade anticâncer destas moléculas conforme o índice de seletividade e inibição da migração das células tumorais gástricas. Outrossim, os fatores secretados pelas células tumorais gástricas induziram uma maior taxa de polarização de macrófagos M2 quando comparado ao controle. A expressão da Gal-9 foi induzida na linhagem KATO III e reduzida na linhagem AGS quando comparada ao controle. Diante dos resultados apresentados, conclui-se que os derivados GaTzLapD e GaTzLau são promissores quanto ao potencial de inibição da Gal-9 e a atividade anticâncer e que os fatores secretados pelas células tumorais gástricas induzem a polarização de macrófagos M2 e regulam a expressão da Gal-9. Contudo, novos ensaios devem ser realizados a fim de elucidar melhor os achados.

Palavras-chave: Câncer gástrico. Galectina-9. Macrófagos associados ao tumor. Derivados de galactosídeos.

ABSTRACT

Cancer (GC) is among the capabilities that kill the most in the world, the fact that it is associated with high metastasis, higher resistance to current therapies in relapse and advanced advances in therapeutic therapy. The metastatic capacity of the GC is associated with its tumor microenvironment, which is responsible for co-opting cells of the immune system to work on behalf of cancer, and among them, macrophages stand out. When co-opted, macrophages generally polarize into M2 macrophages and begin to secrete pro-tumor substances, which inhibit the immune system and promote cell growth. Among the immunosuppressive substances regulated by macrophages are galectins. Galectin-9 (Gal9) is responsible for the lymphocytes and orchestration-responsible-res of recognizing an antitumor immune-tumor response. Due to this problem, results of galactosides are the subject of investigation, in order to act as inhibitors of galectins. In this sense, the aim of this study was to evaluate the effects of new galactos results on the gastric adenocarcinoma line, as well as to evaluate the effects of gastric paracrine signaling in this sense, as well as to evaluate the effects of gastric paracrine signaling on the polarization of macrophages and the expression of Gal-9. For, new galactosides results were able to assess the severity of tumor cell migration and Gal-9 inhibitors. The effects of paracrine signaling on macrophage polarization and Gal-9 expression profile were evaluated by flow cytometry and immunofluorescence. The well-known effects of GaTzLau activity as the potential effect of Gal- activity seen the molecular interaction profile, as the effect of chemical and promissory activity. Furthermore, factors secreted by gastric tumor cells induce a higher rate of polarization of M2 macrophages when compared to control. The expression of Gal-induced induced in the KATO III strain and in the AGS strain when conception went to control. Results presented, it is concluded that the results GaTzLapD and GaTzLapD and GaTzLapD promise regarding the transformation potential of Gal-9 and that the factors secreted by macrophages in front of Gal-9. However, further trials should be performed in order to better elucidate the findings.

Keywords: Gastric cancer. Galectin-9. Tumoral microenvironment. Galactosides derivatives.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Estrutura molecular dos derivados de galactosídeos utilizados no estudo.	22
Figura 1 –	Esquema representando as etapas da montagem da plataforma biossensora.	23
Figura 2 –	Perfil de interação dos novos derivados de galactosídeos com as galectinas 1, 3, 4, 7 e 9.	28
Figura 3 –	Efeito dos derivados de galactosídeos no potencial de migração da linhagem gástrica AGS.	30
Figura 4 –	Estratégia do gate utilizada para análise dos resultados da citometria de fluxo no FACSDiva version 6.1.1.	31
Figura 5 –	Efeito do meio condicionado de linhagens tumorais gástricas sobre a polarização de macrófagos.	32
Figura 6 –	Efeito do meio condicionado de linhagens tumorais gástricas, na expressão intracelular de galectina-9.	33
Figura 7 –	Efeito do meio condicionado sobre a expressão intracelular de Gal-9 na linhagem AGS (estatística).	34
Figura 8 –	Efeitos do MC72h sobre a expressão celular de galectina-9.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Citotoxicidade dos derivados de galactosídeos, demonstradas pela concentração do IC50, em células não transformadas	27
Tabela 2 –	Citotoxicidade dos derivados de galactosídeos, demonstradas pela concentração de IC50, nas células da linhagem de câncer gástrico AGS	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	HIPÓTESES	21
5	MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1	DERIVADOS DE GALACTOSÍDEOS	22
5.2	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO	23
5.3	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS NÃO TRANSFORMADAS	23
5.4	MONTAGEM DA PLATAFORMA BIOSSENSORA	23
5.5	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS	24
5.6	OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO	25
5.7	CITOMETRIA DE FLUXO	25
5.8	IMUNOFLUORESCÊNCIA	26
5.9	TESTE DE MIGRAÇÃO	27
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
6	RESULTADOS	28
6.1	CAPACIDADE DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS DE GALACTOSÍDEOS COM AS GALECTINAS	28
6.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS DERIVADOS DE GALACTOSÍDEOS EM CÉLULAS NÃO TRANSFORMADAS	29
6.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS DERIVADOS DE GALACTOSÍDEOS EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	29
6.4	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO POTENCIAL DE MIGRAÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS	30
6.5	AVALIAÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS, ATRAVÉS DA SINALIZAÇÃO PARÁCRINA DE FATORES	31

	SECRETADOS POR MODELOS CELULARES DE NEOPLASIA GÁSTRICA	
6.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO INTRACELULAR DE GAL-9, ATRAVÉS DA SINALIZAÇÃO PARÁCRINA DE MODELOS CELULARES DE NEOPLASIA GÁSTRICA	33
6.7	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO CELULAR DE GAL-9, NA LINHAGEM KATO III, POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	37
7	DISCUSSÃO	37
8	CONCLUSÃO	41

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que causam mais mortes no mundo (TORRE et al., 2017). Dentre os vários tipos de cânceres, o gástrico se destaca, pois possui uma alta taxa de mortalidade, recidiva e resistência quanto à terapia (RUAN et al., 2020). Atualmente, a terapêutica de câncer gástrico se dá através de quimioterápicos compostos por: trastuzumabe, que é um anticorpo monoclonal para HER-2, juntamente com cisplatina e fluoropirimidina (GELSOMINO et al., 2017).

No entanto, características microambiente tumoral do câncer gástrico permitem com que o mesmo se torne resistente aos métodos quimioterápicos e isso se deve ao microambiente tumoral (*do inglês, tumoral microenvironment TME*) (GELSOMINO et al., 2017., ROJAS et al., 2020). Mesmo diante desse cenário, poucos avanços foram significativos quanto à terapêutica do câncer gástrico (WALDUM; SAGATUN; MJONES, 2017., PERICAY et al., 2019). O TME de tumores gástricos possui características únicas, que permitem com que metástases se desenvolvam com mais facilidade (ROJAS et al., 2020). Além disso, o TME é um ambiente hipersensível, sujeito a alterações moleculares refletem diretamente nas funções neoplásicas, principalmente respostas inflamatórias (LV, BAO, LI, 2017; ZENG et al., 2021).

Parte da composição celular do microambiente tumoral é constituída por linfócitos T e macrófagos, e estes podem desencadear respostas inflamatórias (FIGUEIREDO, 2019). Os macrófagos podem receber sinalizações moleculares das células neoplásicas, e estas desencadeiam mudanças morfológicas e fisiológicas dos macrófagos, num fenômeno denominado de polarização (OYA; HAYAKAWA; KOIKE, 2020). Existem várias classes de macrófagos, no entanto, destacam-se as classes M1 e M2, que são pró e anti-inflamatórias, respectivamente. A classe de macrófagos M1 secretam citocinas que ativam a cascata inflamatória, como por exemplo: IL-1, IL-2, IFN- γ e TNF- α ; enquanto que macrófagos da classe M2 secretam citocinas que ativam a cascata anti-inflamatória, como por exemplo: IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β (WOJDASIEWICZ; PONIATOWSKI; SZUKIEWICZ, 2014).

O crescimento do tumor está associado às sinalizações anti-inflamatórias, responsáveis por secretarem fatores de crescimento (OYA; HAYAKAWA. KOIKE, 2020). Nesse sentido, os macrófagos associados ao tumor (*do inglês Tumor Associated Macrophages TAMs*) geralmente são do tipo M2 (OYA; HAYAKAWA;

KOIKE, 2020; ROJAS et al., 2020). TAMs são cooptados pelas células neoplásicas a partir de sinalizações moleculares, que transformam os macrófagos, fazendo-os secretarem substâncias pró-tumorais (ZENG et al., 2021). Essas substâncias podem ter a função de crescimento e desenvolvimento tumoral, e até mesmo imunossupressora (WANG et al., 2018).

As metástases gástricas geralmente ocorrem devido a secreções orquestradas principalmente pelos TAMs, como por exemplo as ROS (*do inglês: Reactive Oxygen Species*) (OYA; HAYKAWA; KOIKE, 2020; ZENG et al., 2021; JELIC et al., 2021). As ROS são responsáveis por tornar o meio inabitável, num processo chamado de estresse oxidativo (ZENG et al., 2021; JELIC et al., 2021). Com isso, as células cancerígenas tendem a cometer suicídio celular, desprendendo-se da massa tumoral, e causando novas metástases (JELIC et al., 2021). Entretanto, os TAMs também realizam outras funções que propiciam ao desenvolvimento de novas metástases, e estas ainda estão sendo elucidadas.

As moléculas secretadas no TME são de suma importância para o crescimento do tumor, visto que interferem nas relações entre as células normais e neoplásicas (WU et al., 2020). Dentre essas moléculas, algumas inibem o sistema imune, promovendo a evasão do tumor ao mesmo (WANG et al., 2018., WU et al., 2020). Com isso, o tumor progride sem ser reconhecido. Nesse sentido, células neoplásicas tendem a estimularem secreções de moléculas imunossupressoras (WANG et al., 2022). Em cânceres gástricos, moléculas imunossupressoras como a PD-1 já tem o seu papel elucidado quanto à evasão do câncer ao sistema imune (ZHANG et al., 2018). No entanto, outras moléculas estão sob investigação, como as galectinas (WANG et al., 2018., TEO et al., 2021).

As galectinas são moléculas já conhecidas quanto ao seu papel imunossupressor, e são associadas ao mau prognóstico em outros tipos de cânceres (WANG et al., 2018; TEO et al., 2021). A galectina-9 já tem o seu papel comprovado quanto à sinalização no microambiente tumoral no adenocarcinoma pulmonar e osteossarcoma (WANG et al., 2018; LI et al., 2017). A gal-9 liga-se à imunoglobulina mucina 3 (TIM-3), expressa em linfócitos T, induzindo a apoptose ou respostas inflamatórias (RABINOVICH; ILARREGUI, 2009., YANG et al., 2021).

A via galectina-9-TIM-3 inativa os linfócitos T, logo, a via representa um mecanismo de evasão do câncer ao sistema imune (TEO et al., 2021). Nesse sentido, o aumento de linfócitos T TIM-3⁺ em tumores gástricos é inversamente proporcional à sobrevida do paciente (QIN et al., 2019). O bloqueio da via galectina-9-TIM-3 promove a proliferação de células T e secreção de citocinas (QIN et al., 2019). Além de interagir com a TIM-3, a galectina-9 também interage com a galectina-1 expressa em macrófagos, promovendo a reprogramação dos mesmos em TAMs no microambiente de adenocarcinoma gástrico (SAVADKAR et al., 2017; WANG et al., 2022).

Devido às distintas ações exercidas pelas galectinas no microambiente tumoral, inibidores derivados de galactosídeos foram desenvolvidos, com o intuito de ampliar as possibilidades terapêuticas contra o câncer (OROZCO et al., 2018; YANG et al., 2021; ZHAO et al., 2021). Dessa forma, a inibição da galectina-9 ou dos seus ligantes pode impactar diretamente na progressão tumoral, pois além de bloquear a proliferação tumoral, também pode promover a restauração da vigilância imunológica, pela reativação dos linfócitos T e macrófagos (OROZCO et al., 2018; YANG et al., 2021; ZHAO et al., 2021). Diante do exposto, o presente estudo objetiva avaliar os efeitos de secreções tumorais gástricas na polarização de macrófagos, como também na expressão de galectina-9. Além disso, busca testar o potencial inibitório por parte de novos derivados de galactosídeos frente às células de linhagens tumorais gástricas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O CÂNCER GÁSTRICO

O câncer é a segunda causa de mortes em todo mundo, e dentre os tipos de cânceres, o câncer gástrico é o terceiro em taxa de mortalidade (TORRE et al., 2017). Cerca de 90% dos casos de cânceres gástricos no mundo estão associados a infecções primárias, causadas pela bactéria *Helicobacter pilory* (ALIPOUR, 2020). A elevada taxa de mortalidade se deve à alta incidência e recidiva da doença, somado com o alto potencial metastático (RUAN et al., 2020).

O desenvolvimento do câncer gástrico depende de vários fatores, que em conjunto, resultam na doença maligna (FUNES, 2018). Dentre esses fatores, se destaca a evasão do câncer ao sistema imune (FUNES, 2018). Essa evasão permite com que as células cancerígenas não sejam reconhecidas pelas células do sistema imune dos indivíduos (FUNES, 2018., ZEESHAN, 2017). Em neoplasias gástricas, esse mecanismo de evasão é desenvolvido, principalmente, a partir de interações entre as células cancerígenas e outros tipos celulares que circundam o tumor (incluindo células do sistema imune), compondo o chamado microambiente tumoral (OYA; HAYAKAWA; KOIKE, 2020).

2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL GÁSTRICO

O microambiente tumoral gástrico é composto tanto por células cancerígenas, como por células do próprio organismo, tais como linfócitos, macrófagos, fibroblastos, células dendríticas, entre outras (OYA; HAYAKAWA; KOIKE, 2020., WU et al., 2020). Nele, substâncias são secretadas tanto pelas células cancerígenas, como pelas células circundantes (WU et al., 2020).

Nesse sentido, substâncias secretadas pelo câncer cooptam as demais células deste microambiente e inativam o sistema imune, enquanto que as células do microambiente tumoral secretam substâncias que promovem o crescimento do câncer (FUNES, 2018). Como por exemplo, a cooptação de macrófagos, que quando associados ao tumor (TAMs), secretam substâncias pró-tumorais, como fatores de crescimento (FUNES, 2018., NGAMBENJAWONG; GUSTAFSON; PUN, 2017). Como também, a inativação de linfócitos T, acarretando no não reconhecimento de células tumorais pelo sistema imunológico (SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018).

Os macrófagos são células do sistema imune inato, derivadas de monócitos circulantes, que quando chegam a um tecido, ativam-se, modificando-se em

macrófagos (GENTEK; MOLAWI; SIEWEKE, 2014). A ativação dos macrófagos depende diretamente dos estímulos recebidos, que influenciam na sua fisiologia e morfologia (GENTEK; MOLAWI; SIEWEKE, 2014., VOGEL et al., 2014).

Quando ativados, os macrófagos se dividem em duas grandes classes, M1 e M2, dependendo dos estímulos recebidos (VOGEL et al., 2014), esse fenômeno é chamado de polarização de macrófagos. A classe M1 está associada a processos inflamatórios, e inibem o crescimento das células, enquanto que a classe M2 está associada a processos anti-inflamatórios e promovem o crescimento celular (OYA; HAYAKAWA; KOIKE, 2020., ROJAS et al., 2020). Assim, macrófagos M1 inibem a progressão tumoral, em contrapartida, macrófagos M2 promovem o crescimento do câncer (ROJAS et al., 2020). Então, TAMs geralmente são do tipo M2 (OYA; HAYAKAWA; KOIKE, 2020; ROJAS et al., 2020).

O microambiente tumoral gástrico é responsável por secretar substâncias que cooptam os macrófagos, fazendo-os trabalharem para o tumor (VOGEL et al., 2014). Os TAMs são uma das células mais importantes, referentes ao microambiente tumoral. No câncer gástrico, os TAMs orquestram diversas secreções (além de fatores de crescimento), que podem induzir novas metástases, como é o caso das ROS (JELIC et al., 2021). As ROS são responsáveis por criar o chamado estresse oxidativo, que por sua vez sinaliza para as células cancerígenas que aquele ambiente é inóspito, fazendo com que as mesmas cometam suicídio celular e colonizem outras regiões do corpo (JELIC et al., 2021). Além disso, os TAMs também secretam substâncias que inativam o sistema imune, como as galectinas (TEO et al., 2021). As galectinas também podem se ligar ao receptor dectina-1, cooptando outros macrófagos, sendo assim um efeito em cascata (TEO et al., 2021).

Os linfócitos T, por sua vez, são células do sistema imune adaptativo, e tem como função reconhecer antígenos/células tumorais, orquestrando a possível resposta do sistema imunológico (WANG et al., 2018). Nesse contexto, os linfócitos T têm a função de reconhecerem o tumor gástrico, e preparar uma resposta imunológica com a finalidade de extinguir o mesmo (WANG et al., 2018). No entanto, substâncias liberadas pelo tumor podem inibir a ação dos linfócitos T (MIMURA et al., 2021). A substância mais conhecida, é a proteína PD-1, que interage com o receptor PD-L1, provocando apoptose nos linfócitos T, inativando-os quando em contato com o microambiente tumoral (SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018., MIMURA et al., 2021).

2.3 GALECTINAS E GALECTINA-9

As galectinas são lectinas, pois possuem a capacidade de se ligar a moléculas de carboidratos, e desempenham distintas funções fisiológicas, como promover inflamações, respostas imunes, migração celular, autofagia e sinalizações (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018). E estão associadas a doenças cardíacas, fibrose pulmonar e até mesmo vários tipos de cânceres (JOHANNES; JACOB; LEFFLER, 2018). As galectinas, já têm o seu papel elucidado quanto à supressão do sistema imune (WANG et al., 2018., TEO et al., 2021), e são expressas principalmente por macrófagos. Originalmente, as galectinas têm o papel de frear a resposta imunológica exacerbada, evitando reações de hipersensibilidade (WAN et al., 2021). Quando associadas ao microambiente tumoral, as galectinas têm o papel de inativar o sistema imune (WAN et al., 2021), isto é, facilitar a evasão do tumor à vigilância imunológica. Nesse sentido, quanto maior for a secreção de galectinas no microambiente tumoral, maior será a progressão tumoral, e pior será o prognóstico do paciente acometido (WAN et al., 2021; WANG et al., 2018).

Dentre os tipos de galectinas, a galectina-9 se destaca pelo seu papel parecido com a proteína PD-1, pois interage com o receptor Imunoglobulina Mucina 3 (TIM-3), provocando a inativação dos linfócitos T (MANSORUNOV et al., 2021). Nesse sentido, pesquisas envolvendo a expressão de galectina-9 no contexto do microambiente tumoral vêm sendo desenvolvidas (YANG et al., 2021), a fim de entender melhor como funcionam os mecanismos de evasão do câncer ao sistema imune. Quanto ao adenocarcinoma pulmonar e osteossarcoma, a gal-9 já tem o seu papel elucidado, onde maiores concentrações da molécula, no microambiente tumoral, significam um mal prognóstico ao paciente (WANG et al., 2018; LI et al., 2017).

2.4 A PROBLEMÁTICA DO CÂNCER GÁSTRICO

A elevada taxa de mortalidade relacionada a casos de neoplasias gástricas se deve à alta incidência e recidiva da doença, somado com o alto potencial metastático (RUAN et al., 2020). O único tratamento considerado radical, é a remoção cirúrgica da doença, que quando associada ao diagnóstico precoce, quimioterapias e radioterapias, proporciona uma taxa de sobrevida em 5 anos >95% (SONG et al., 2017). No entanto, cerca de 80% dos casos da doença são diagnosticados de forma tardia, dificultando ainda mais o processo terapêutico (SONG et al., 2017). Contudo,

poucos avanços quanto à terapia do câncer gástrico foram instituídos até o presente momento (PERICAY et al., 2019).

Devido a essa carência terapêutica, novos estudos, com diferentes moléculas se mostram promissores, frente ao câncer gástrico. A inibição das galectinas talvez represente uma boa opção de estudo, visto que o seu papel é bem parecido com a proteína PD-1, que já tem o seu papel elucidado (WANG et al., 2018; TEO et al., 2021). Teoricamente, a inibição das galectinas pode retomar a vigilância imunológica, pois assim os linfócitos T estariam ativos novamente, podendo reconhecer os antígenos de células cancerígenas (TEO et al., 2021). Nesse sentido, a inibição das galectinas pode representar um novo potencial terapêutico que ainda deve ser elucidado, e não somente de neoplasias gástricas, mas também de outros tipos de cânceres.

Com base nisso, inibidores derivados de galactosídeos foram desenvolvidos, em parceria com o professor José Ricardo Alves, da UFMG, com a finalidade de inibir a ação das galectinas, e talvez proporem uma atividade anticâncer.

De acordo com os fatos apresentados, o presente trabalho procura avaliar o potencial dos novos derivados de galactosídeos, em relação à galectina-9 e à atividade cancerígena; bem como avaliar os efeitos das secreções do microambiente tumoral do câncer gástrico sobre a polarização dos macrófagos e o perfil de expressão da galectina-9.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos microambiente tumoral do câncer gástrico sobre a polarização dos macrófagos e o perfil de expressão da Galectina-9, bem como avaliar o potencial inibidor da Galectina-9 de novos derivados de galactosídeos em modelo celular de neoplasia gástrica.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Investigar o potencial de interação dos novos derivados de galactosídeos, frente à galectina-9;

3.2.2 Analisar a citotoxicidade dos novos derivados de galactosídeos em PBMCs e modelos celulares de neoplasia gástrica;

3.2.3 Avaliar os efeitos da sinalização parácrina de linhagens de câncer gástrico sobre a polarização de macrófagos;

3.2.4 Avaliar os efeitos da sinalização parácrina de linhagens de câncer gástrico sobre a expressão de galectina-9 em macrófagos;

4 HIPÓTESES

4.1 Novas moléculas derivadas de galactosídeos interagem com a galectina-9;

4.2 Novas moléculas derivadas de galactosídeos possuem atividade anticâncer frente a linhagens tumorais de adenocarcinoma gástrico;

4.3 Substâncias secretadas pelas células de linhagens tumorais de adenocarcinoma gástrico induzem a polarização de macrófagos;

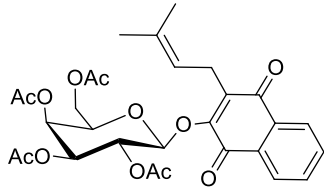
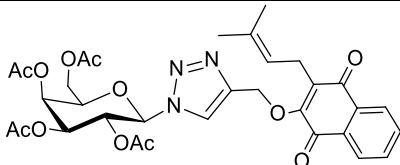
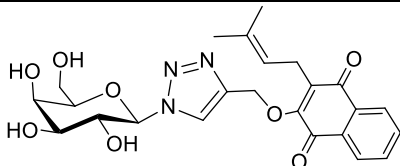
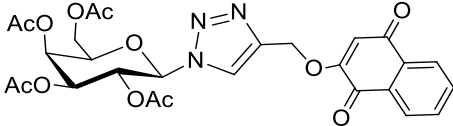
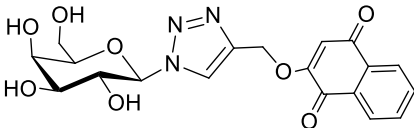
4.4 Substâncias secretadas pelas células de linhagens tumorais de câncer gástrico regulam a expressão de Gal-9 em macrófagos associados ao microambiente tumoral do adenocarcinoma gástrico;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DERIVADOS DOS GALACTOSÍDEOS

A síntese e caracterização estrutural dos novos derivados de galactosídeos foram realizadas pelo professor José Ricardo Alves da Universidade Federal de Minas Gerais (Quadro 1).

Quadro 1: Estrutura molecular dos derivados de galactosídeos utilizados no estudo

Derivados	M.M (g/mol)	Massa	Estrutura
GaLap	572,56	16,1 mg	
GaTzLap	653,63	14,9 mg	
GaTzLapD	485,49	15,0 mg	
GaTzLau	585,52	14,2 mg	
GaLau	417,37	14,7 mg	

5.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

Para análise da polarização dos macrófagos, expressão intracelular de Gal-9 e citotoxicidade, células mononucleares do sangue periférico (*do inglês, Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) foram isoladas a partir do sangue de doadores saudáveis por centrifugação com Ficoll Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). Os PBMCs foram incubados com coquetel de isolamento de anticorpos (50µL/mL) e coquetel de remoção de plaquetas (50µL/mL). As células monocíticas e linfocíticas foram isoladas e cultivadas em placas de 6 poços (10^6 células/1000 µL), em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Foi adicionado GM-CSF aos poços, com o intuito de diferenciar os monócitos em macrófagos, esperando assim de cinco a sete dias. Estas células foram cultivadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

5.3 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS NÃO TRANSFORMADAS

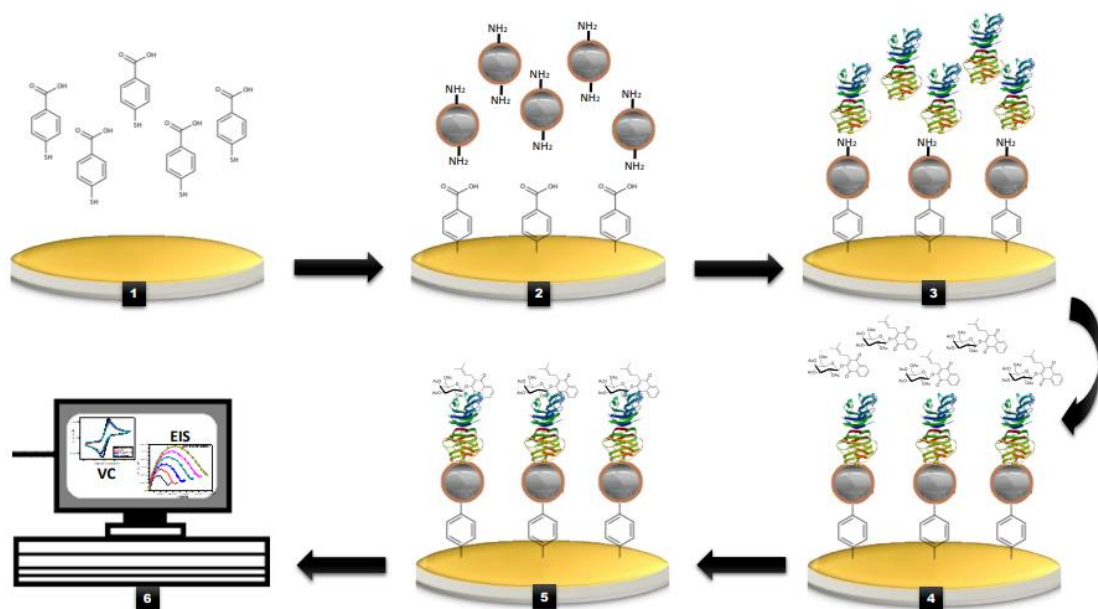
Com a finalidade de testar a toxicidade dos derivados de galactosídeos sobre as células normais do corpo, as PBMC's foram plaqueadas (5×10^5 células/poço) em placas de cultura de 96 poços e incubadas em estufa de atmosfera úmida à 37°C com 5% CO₂ durante 24 horas. Em seguida, os derivados de galactosídeos foram adicionados nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 µM e as placas foram incubadas por 48 horas. O controle do veículo (DMSO) foi adicionado nas concentrações de 0,1 e 0,2%. Após 48 horas de incubação com os novos derivados de galactosídeos, 20 µL de MTT (3-4,5-dimetil-tiazol-il-2,5-difeniltetrazólio) foram adicionados a cada poço e após 3 horas 130 µL de SDS (*do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate*) 20% foram adicionados para a dissolução dos cristais de formazan, guardando a reação ao abrigo da luz por 24 horas. Após esse período, a leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro no leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) em absorbância de 570 nm.

5.4 MONTAGEM DA PLATAFORMA BIOSSENSORA

Em parceria com o laboratório BioNano, juntamente com o professor César Augusto de Souza Andrade, visando avaliar o potencial inibitório de galectinas, pelos derivados de galactosídeos, foi feita a montagem de Plataforma Biossensora (Figura

1): MBA 30mM + Fe₃O₄@Quitosana + GALECTINA + GALACTOSÍDEO. A plataforma em si constitui em: A) Ácido 4-Mercaptobenzóico (MBA) “30mM” (5 min); B) EDC NHS (5 min) + Fe₃O₄@Quitosana (5 min); C) Gluteraldeído 7% (5 min) + Galectina “1 ng” (5 min); D) Galactosídeo “15 mM” (GaLap / GaLau / GaTzLap / GaTzLapD / GaTzLau) (5 min); E) Interação GALECTINA X GALACTOSÍDEOS; F) A avaliação eletroquímica utilizou Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).

Figura 1: Esquema representando as etapas da montagem da plataforma biossensora. Os processos 1, 2 e 3 representam a fixação das galectinas na plataforma biossensora. Os processos 4 e 5 representam a adição e a ligação dos derivados de galactosídeos às galectinas. O processo 6 evidencia a leitura do potencial inibitório dos derivados de galactosídeos.



5.5 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS TUMORAIS

Com o intuito de testar a toxicidade dos derivados de galactosídeos sobre as células neoplásicas, as células tumorais da linhagem gástrica AGS foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) em placas de cultura de 96 poços e incubadas em estufa de atmosfera úmida à 37°C com 5% CO₂ durante 24 horas. Em seguida, os derivados de galactosídeos foram adicionados nas concentrações de 5, 10, e 50 µM e as placas foram incubadas por 72 horas. O controle do veículo (DMSO) foi adicionado na concentração de 0,1%. Após 72 horas de incubação com os novos derivados de galactosídeos, 20 µL de MTT foram adicionados a cada poço e após 3 horas 130 µL

de SDS 20% foram adicionados para a dissolução dos cristais de formazan, guardando a reação ao abrigo da luz por 24 horas. Após esse período, a leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro no leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) em absorbância de 570 nm.

5.6 OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO

Visando simular a sinalização parácrina que ocorre no microambiente tumoral, decidimos coletar o meio utilizado na cultura celular das linhagens gástricas, donde estão as substâncias secretadas pelas células cancerígenas. E para isso, as células cultivadas para a obtenção do meio condicionado 72h (MC72h) foram das linhagens de adenocarcinoma gástrico AGS e KATO III, que foram descongeladas, expandidas e incubadas por um período de três semanas. Depois desse período de incubação o sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 800g por 3 minutos e filtrado com filtro de seringa. Com isso, as secreções de fatores a partir das células neoplásicas são obtidos e colocados sobre os macrófagos oriundos de PBMCs, com a finalidade de simular o microambiente tumoral gástrico, onde as substâncias contidas no MC72h, que foram secretadas pelo tumor transformarão as PBMCs em células associadas ao tumor.

5.7 CITOMETRIA DE FLUXO

Para identificar a polarização de macrófagos e a expressão intracelular de Gal-9, as PBMCs foram plaqueadas em placas de 8 poços, numa concentração de 2×10^6 /poço. Em seguida, adicionamos o GM-CSF (0,5µl/mL), a fim de induzir a diferenciação dos monócitos em macrófagos, e esperamos 5 dias. Após isso, aplicamos os estímulos utilizados nos testes, sendo LPS e IFN-γ para polarizar os macrófagos em M1, e IL-4 e IL-13 para polarizar os macrófagos em M2. Separadamente, também adicionamos o MC72h aos testes, por um período de 72h. No total, 8 poços foram utilizados, com as seguintes condições em duplicatas: Controle negativo (sem estímulos); Controle com estímulos para M1 + M2; Macrófago + Meio Condicionado 72h; Macrófago + Meio Condicionado 72h + M1 + M2, estimulando com LPS, IFN-γ, IL-4 e IL-13. Concentrações dos estímulos utilizadas: LPS → 5µl/ml; IFN-γ → 1µl/ml; IL-4 → 0,5µL/ml; IL-13 → 0,25µl/ml.

Numa câmara de fluxo laminar, adicionamos a Acutase aos poços, incubando por 10 minutos na estufa, a fim de deaderir as células. Após isso, inativamos a Acutase

com meio completo a 10% (RPMI + Soro Fetal Bovino), numa proporção de 1:2, respectivamente. Posteriormente, as células foram ressuspensas em tubos Falcon de 15mL/poço e centrifugadas em 2000 RPM, 6 de ACC e 4 de DCC, por 5 minutos. Por conseguinte, levamos os tubos para a sala da citometria, onde descartamos os sobrenadantes contidos nos tubos e ressuspensamos o Pellet em 2 mL de PBS. Então, retiramos o conteúdo dos tubos, passando para tubos de citometria, filtrando-os. Em seguida, duas sucessivas lavagens foram executadas, nas especificações relatadas anteriormente. Após a segunda lavagem, descartamos o sobrenadante, e adicionamos os anticorpos de superfície celular para monócitos, macrófagos M1 e M2 (CD14 FIT-C, CD80 APC-A7 e CD206 PE, respectivamente), incubando por 20 minutos em local escuro. Após a incubação, adicionamos 2mL de PBS, e realizamos mais uma lavagem. Depois da lavagem, ressuspensamos em 300µl e levamos ao citômetro. Para a marcação intracelular de galectina-9, adicionamos 1mL de Fixation/tubo e incubamos durante 45 min em local escuro. Após isso, adicionamos 2mL de Permeabilization Buffer e centrifugamos novamente, seguindo as mesmas condições. Descartamos o sobrenadante e adicionamos o anticorpo para gal-9 (Gal-9 PerCP/Cy 5-5), incubando por 45 min em local escuro. Adicionamos mais 2mL de Buffer, e realizamos mais uma lavagem na centrífuga. Descartamos o sobrenadante, adicionamos 300µl de PBS e levamos ao citômetro para avaliar a marcação intracelular de gal-9.

5.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para avaliar a expressão celular de Gal-9, os macrófagos oriundos de PBMCs foram plaqueados em placas de 24 poços, numa concentração de 2×10^5 /poço. Em seguida, adicionamos o GM-CSF (0,5µl/mL) a fim de induzir a diferenciação dos monócitos em macrófagos, e esperamos 5 dias. Após esse tempo, adicionamos o MC aos poços (exceto controle negativo), esperando mais 72h antes de realizar a imunofluorescência. O controle negativo consiste da adição de apenas o anticorpo secundário, enquanto que o teste dispunha do anticorpo primário e secundário, descritos abaixo.

As células contidas nos poços primeiramente foram fixadas com metanol e acetona 22, numa proporção de 1:1 por 10 minutos a -20°C, e posteriormente lavadas com PBS 1x. Depois, bloqueamos com PBS/BSA (Bovine Serum Albumin) 5%, por 1 hora. Posteriormente, adicionamos 50µl/poço do anticorpo primário (Gal-9 Rabbit

Polyclonal - IgG), diluído em PBS/BSA 0,5% 1:100, por 12-16 horas, em câmara úmida. Após esse tempo, as células foram lavadas 3 vezes com PBS/BSA 0,5% por 10 minutos, e incubadas durante 1h com o anticorpo secundário: Anti-Rabbit Polyclonal – IgG. Depois, marcamos os núcleos celulares, utilizando o DAPI, diluído em PBS/BSA 5% 1:500, por 2 minutos. Em seguida, lavamos novamente os poços com PBS/BSA 0,5%, e depois levamos ao microscópio para visualização.

5.9 TESTE DE MIGRAÇÃO

A fim de identificar o potencial inibitório dos derivados de galactosídeos sobre as células cancerígenas, as células da linhagem AGS foram plaqueadas em placas de 96 poços, numa concentração de 2×10^4 /poço. Então, as células foram incubadas na estufa de atmosfera, por 24h. No dia seguinte, com uma ponta de ponteira P10, fizemos dois riscos no assoalho dos poços, para que as células fossem removidas, expondo a área de migração. Então, os poços foram lavados com meio de cultura, a fim de retirar os restos celulares que foram removidos pela ponteira, e o meio de cultura foi renovado em cada poço. Juntamente com o meio, os derivados de galactosídeos foram adicionados aos poços do teste, e uma foto da área de migração no momento 0 hora foi tirada em cada poço. Por conseguinte, as células foram incubadas novamente na estufa por 24h. Após esse período, retiramos novamente as fotos, no mesmo quadrante para avaliar as diferenças entre os poços controle e teste.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

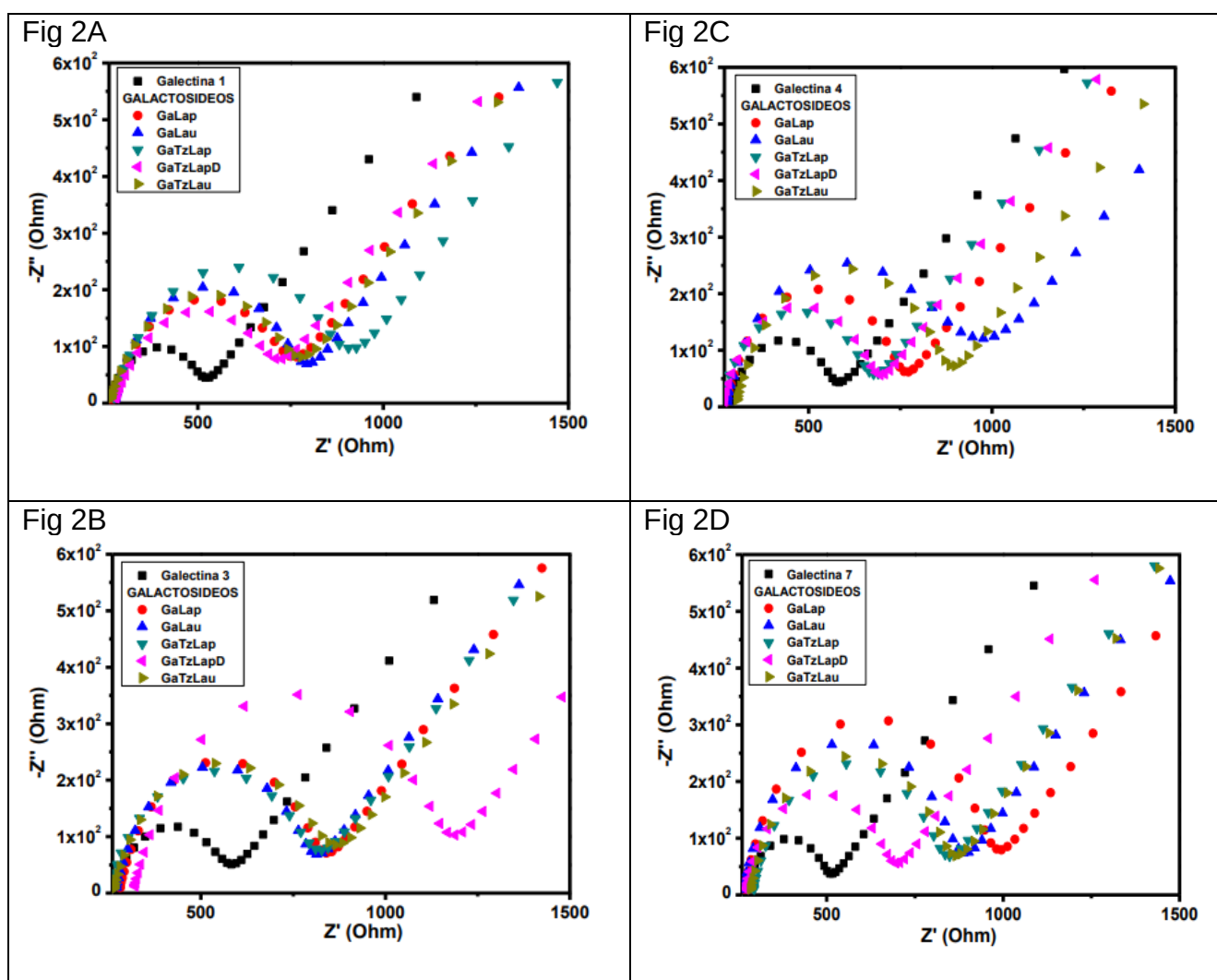
Os procedimentos experimentais foram repetidos pelo menos duas vezes e apresentados como média $\pm$ desvio padrão (dados paramétricos) ou mediana $\pm$ variação (dados não paramétricos). Foi realizado o teste sendo significativo valor e $p \leq 0,05$.

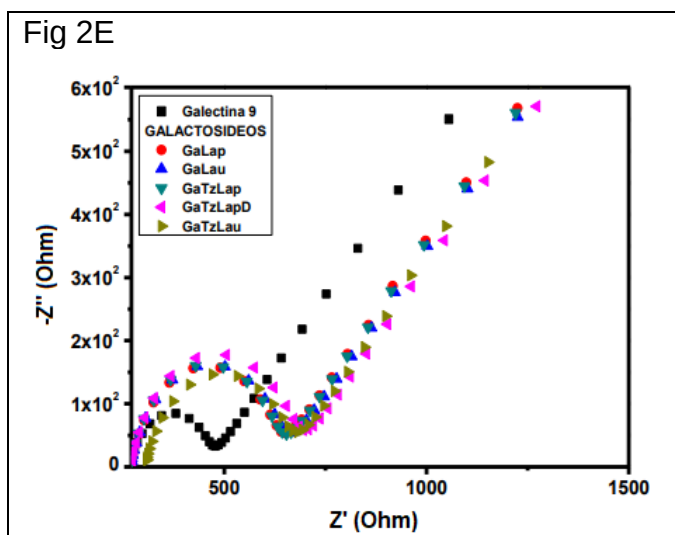
6 RESULTADOS

6.1 Capacidade de interação dos derivados de galactosídeos com as galectinas

Para avaliar a interação dos derivados de galactosídeos GaLap, GaLau, GaTzLap, GaTzLapD e GaTzLau (concentração de 15mM), as galectinas Gal-1, Gal-3, Gal-4, Gal-7 e Gal-9, foram utilizadas como base na Montagem de Plataforma Biossensora. Os resultados evidenciaram que em comparação com as galectinas 1, 3, 4 e 7 (Fig 2A, 2B, 2C, 2D e 2E), a Gal-9 apresentou maior interação com os derivados GaLap, GaLau e GaTzLapD (Figura 2). Como a Gal-9 é o objetivo do presente estudo, apenas o ensaio pertinente à Gal-9 será levado em consideração na discussão dos resultados.

Figura 2: Perfil de interação dos novos derivados de galactosídeos com as galectinas 1(2A), 3(2B), 4(2C), 7(2D), e 9(2E) a partir de plataforma biossensora.





6.2 Avaliação da toxicidade dos derivados de galactosídeos em células não transformadas

A análise da toxicidade frente às PBMC's revelou diferenças entre os derivados de galactosídeos avaliados. Os derivados GaLau e GaLap foram os mais tóxicos entre os derivados avaliados apresentando os mais baixos valores de IC50 (Tabela 01). O derivado GaTzLap apresentou toxicidade. Os derivados GaTzLau e GaTzLapD não apresentaram toxicidade frente as PBMC's.

Tabela 1: Citotoxicidade dos derivados de galactosídeos, demonstradas pela concentração do IC50, em células não transformadas.

Derivados de galactosídeos	PBMC's (μM)
GaLau	$\leq 5 \pm 0,09$
GaTzLau	> 80
GaLap	$\leq 4,08 \pm 0,3$
GaTzLap	$\leq 43,41 \pm 2,86$
GaTzLapD	> 80

6.3 Avaliação da toxicidade dos derivados de galactosídeos em células de adenocarcinoma gástrico

A análise da toxicidade frente ao modelo de câncer gástrico AGS revelou diferenças entre os dois derivados de galactosídeos considerados não tóxicos no resultado anterior. O derivado GaTzLapD foi o mais tóxico entre os derivados

avaliados, apresentando o mais baixo valor de IC₅₀ (Tabela 2). O derivado GaTzLau representou toxicidade moderada frente à linhagem de câncer gástrico.

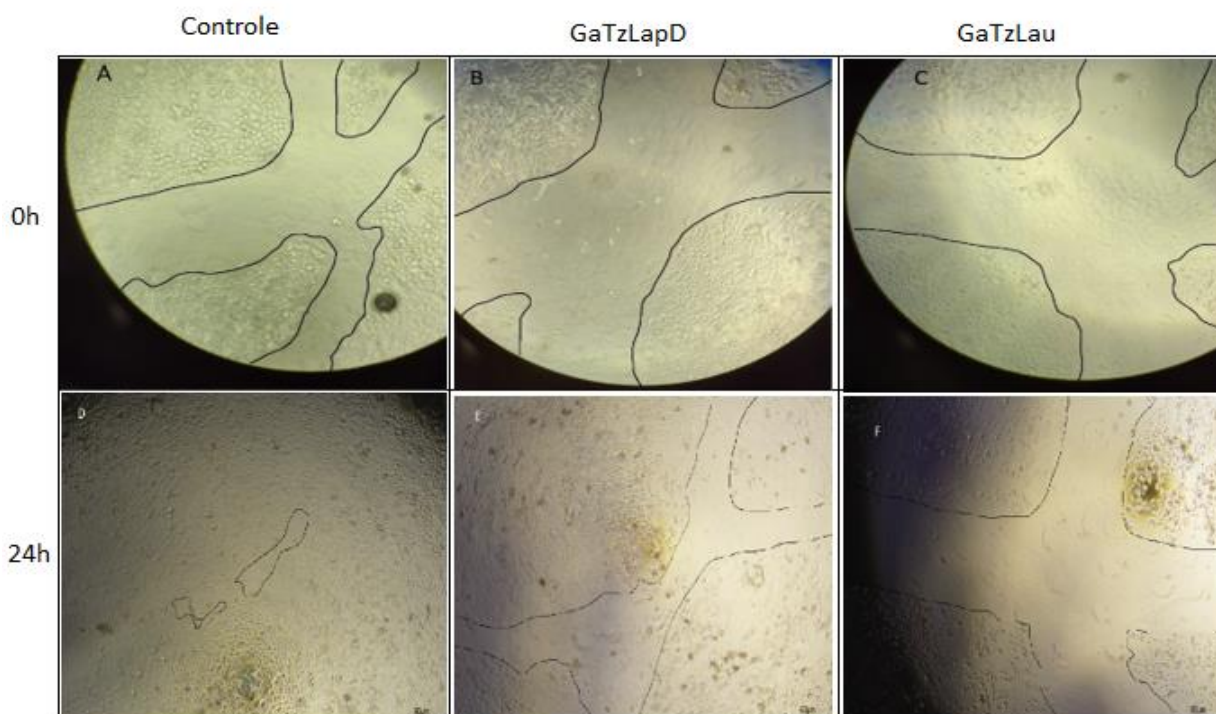
Tabela 2: Citotoxicidade dos derivados de galactosídeos, demonstradas pela concentração de IC₅₀, nas células da linhagem de câncer gástrico AGS.

Derivados de galactosídeos	AGS (μM)
GaTzLapD	$\leq 21,6 \pm 1,9$
GaTzLau	$\leq 31,8 \pm 5,1$

6.4 Avaliação da inibição do potencial de migração dos novos derivados

Por fim, decidimos fazer o teste de ensaio de ferida com o intuito de identificar se os compostos GaTzLapD e GaTzLau inibem o potencial de migração das células tumorais, nas concentrações de IC₅₀ obtidas anteriormente. Os achados revelaram que tanto o GaTzLapD quanto o GaTzLau inibiram o a migração das células tumorais da linhagem AGS (Figura 3), evidenciado pela comparação entre as áreas de migração do poço controle (apenas células tumorais da linhagem AGS) com as áreas de migração dos poços com os derivados de galactosídeos, após 24 horas (Figura 3B).

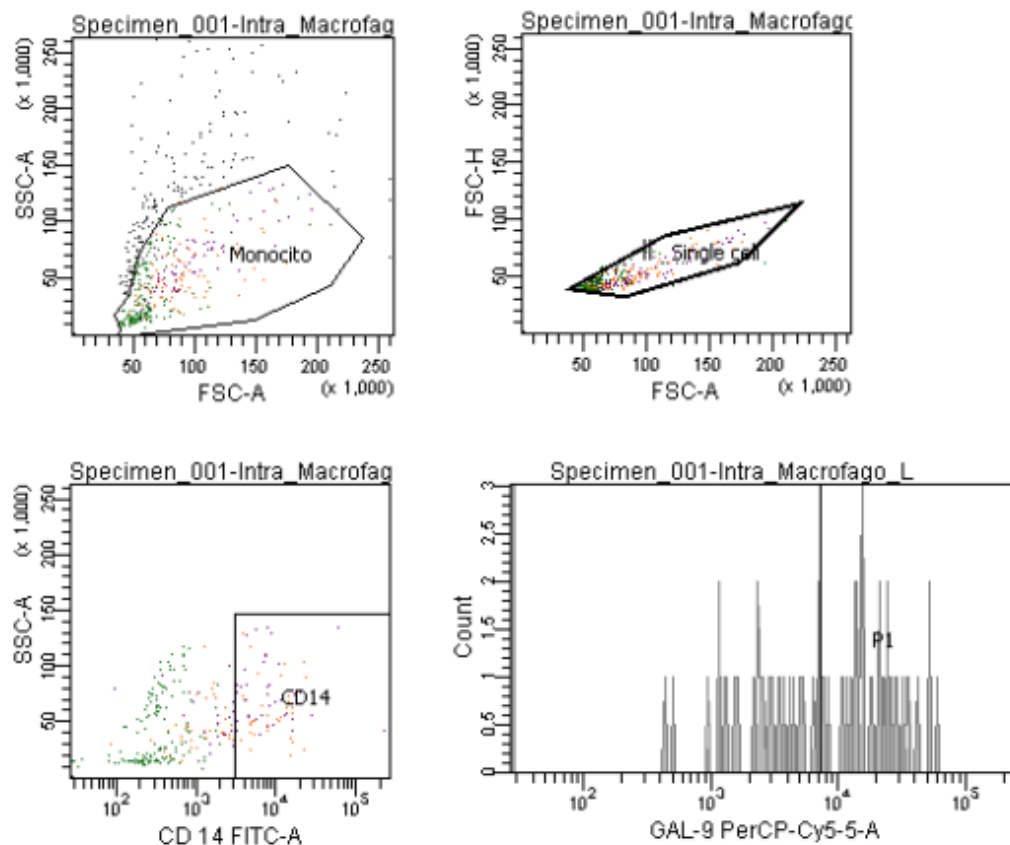
Figura 3: Efeito dos derivados de galactosídeos no potencial de migração da linhagem gástrica AGS, nos momentos 0h (A, B e C) e 24h (D, E e F).



6.5 Avaliação da polarização de macrófagos, através da sinalização parácrina de fatores secretados por modelos celulares de neoplasia gástrica

Para avaliar a polarização de macrófagos, a citometria de fluxo foi utilizada com seus respectivos marcadores. A estratégia do *gate* (Figura 4) é a mesma para todos os testes contendo citometria. Os resultados evidenciaram que as substâncias secretadas pelas linhagens KATO III e AGS, contidas no MC72h, promoveram uma maior polarização de macrófagos, em comparação com o controle, observado a partir da diferença entre os percentuais de polarização (Figura 5A e 5B). Além disso, os fatores secretados pelas células cancerígenas, das duas linhagens, promoveram um diferente perfil de polarização de macrófagos, favorecendo a classe M2, observado através da comparação entre as condições contendo o MC72h e a condição contendo estímulos para M1 e M2.

Figura 4: Estratégia do *gate* utilizada para análise dos resultados da citometria de fluxo no FACSDiva version 6.1.1



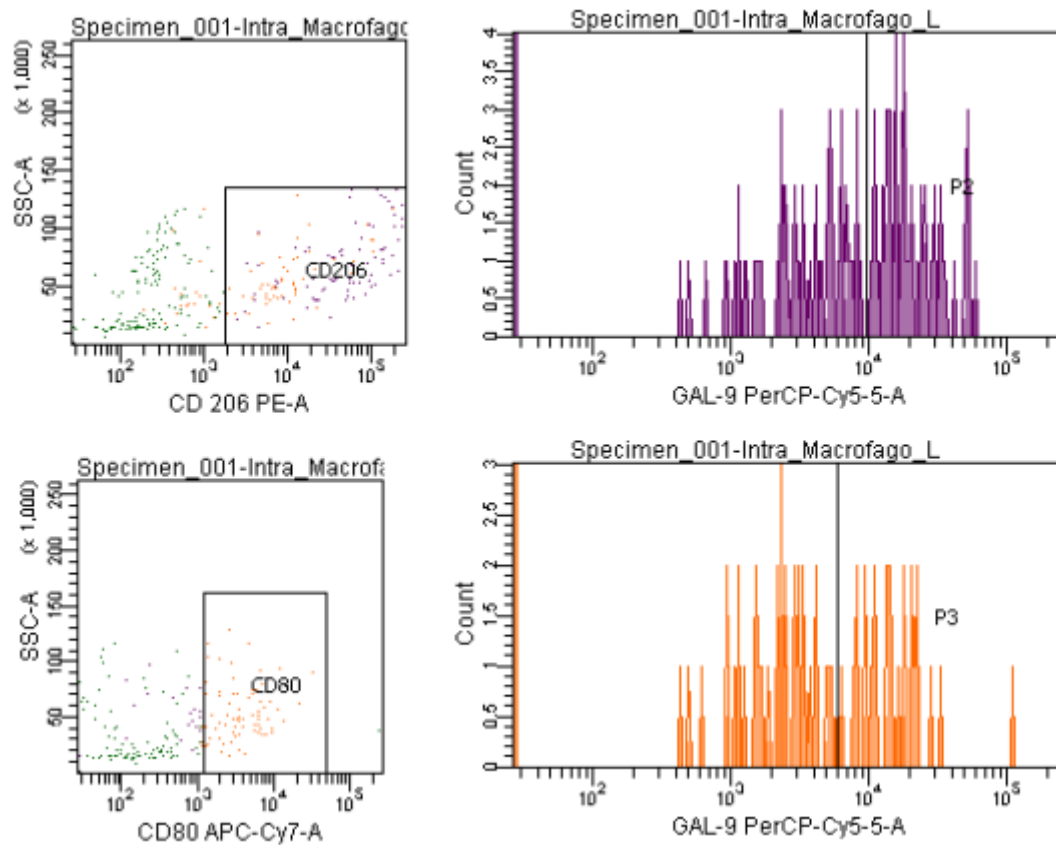


Figura 5: Efeito do meio condicionado de linhagens tumorais gástricas sobre a polarização de macrófagos. (A: na linhagem KATO III) (B: na linhagem AGS).

Fig 5A: Efeito do meio condicionado da linhagem tumoral gástrica KATO III sobre a polarização de macrófagos.

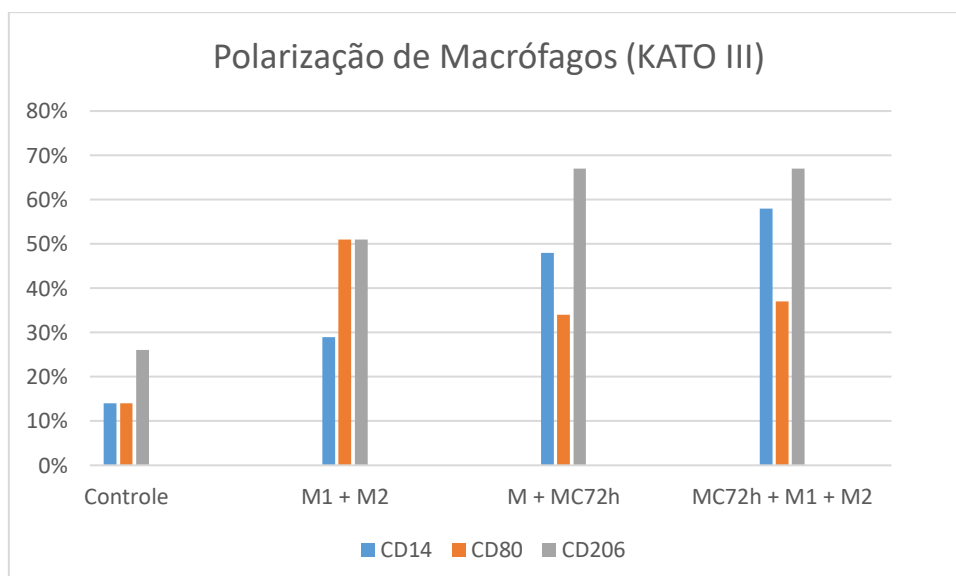
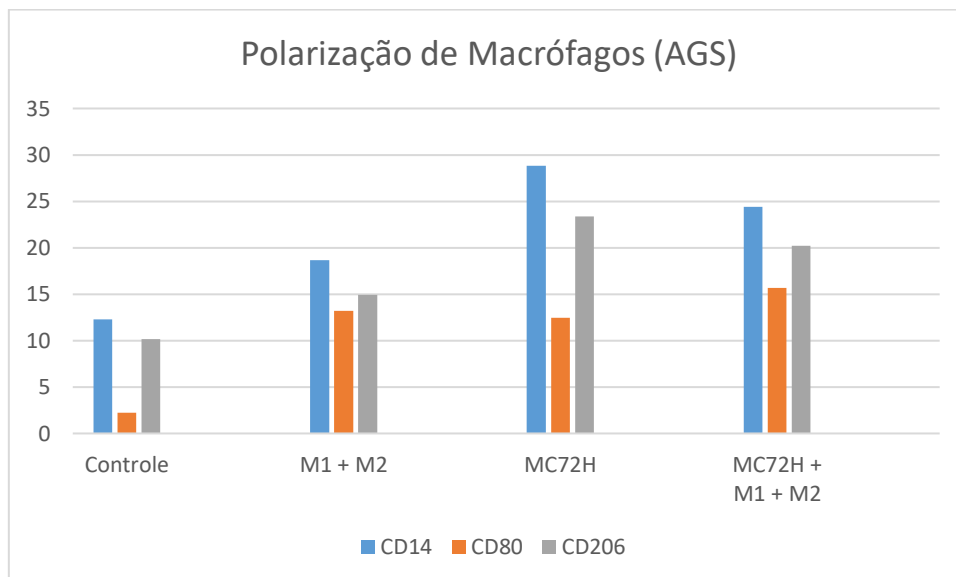


Fig 5B: Efeito do meio condicionado da linhagem tumoral gástrica AGS sobre a polarização de macrófagos.



6.6 Avaliação da expressão intracelular de Gal-9, através da sinalização parácrina de modelos celulares de neoplasia gástrica

Com base nos resultados anteriores, decidimos avaliar também os efeitos das substâncias secretadas pelas linhagens KATO III e AGS, na expressão intracelular de Gal-9. Em relação à KATO III (Figura 6A), as substâncias contidas no MC72h induziram uma maior expressão intracelular de galectina-9, evidenciada pela diferença percentual entre o controle e às condições contendo o MC72h. No entanto, na linhagem AGS (Figura 6B), os fatores secretados pelas células cancerígenas inibiram a expressão de galectina-9, quando comparamos a expressão do controle com as condições contendo o MC72h; corroborado por testes estatísticos em CD14 e CD206 (Figura 7A e 7B), onde $p = 0,0069$ e $0,0171$, respectivamente, pois $p \leq 0,05$ indica uma diferença significativa para os testes. Verificou-se nas duas linhagens, que na condição contendo estímulos M1 e M2, a expressão de galectina-9 foi maior que em todas as outras condições.

Figura 6: Efeito do meio condicionado de linhagens tumorais gástricas, na expressão intracelular de galectina-9. (A: na linhagem KATO III) (B: na linhagem AGS)

Figura 6A: Efeito do meio condicionado da linhagem tumoral gástrica KATO III sobre a expressão intracelular de galectina-9.

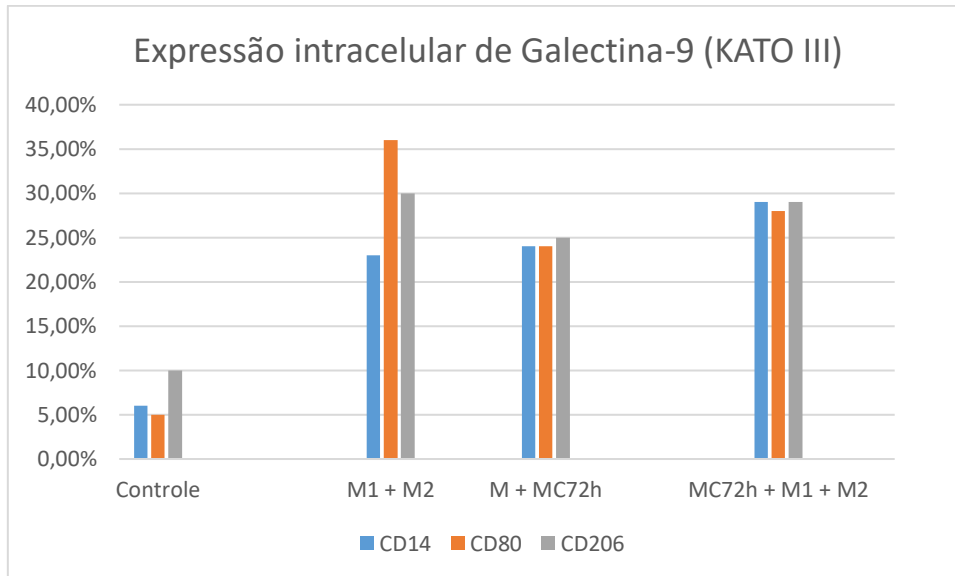


Figura 6B: Efeito do meio condicionado da linhagem tumoral gástrica AGS sobre a expressão intracelular de galectina-9.

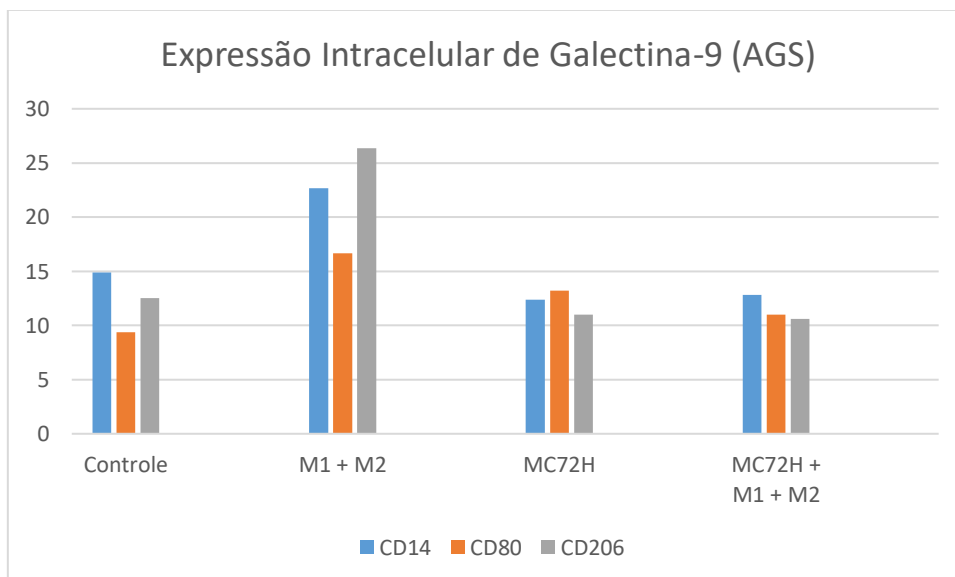
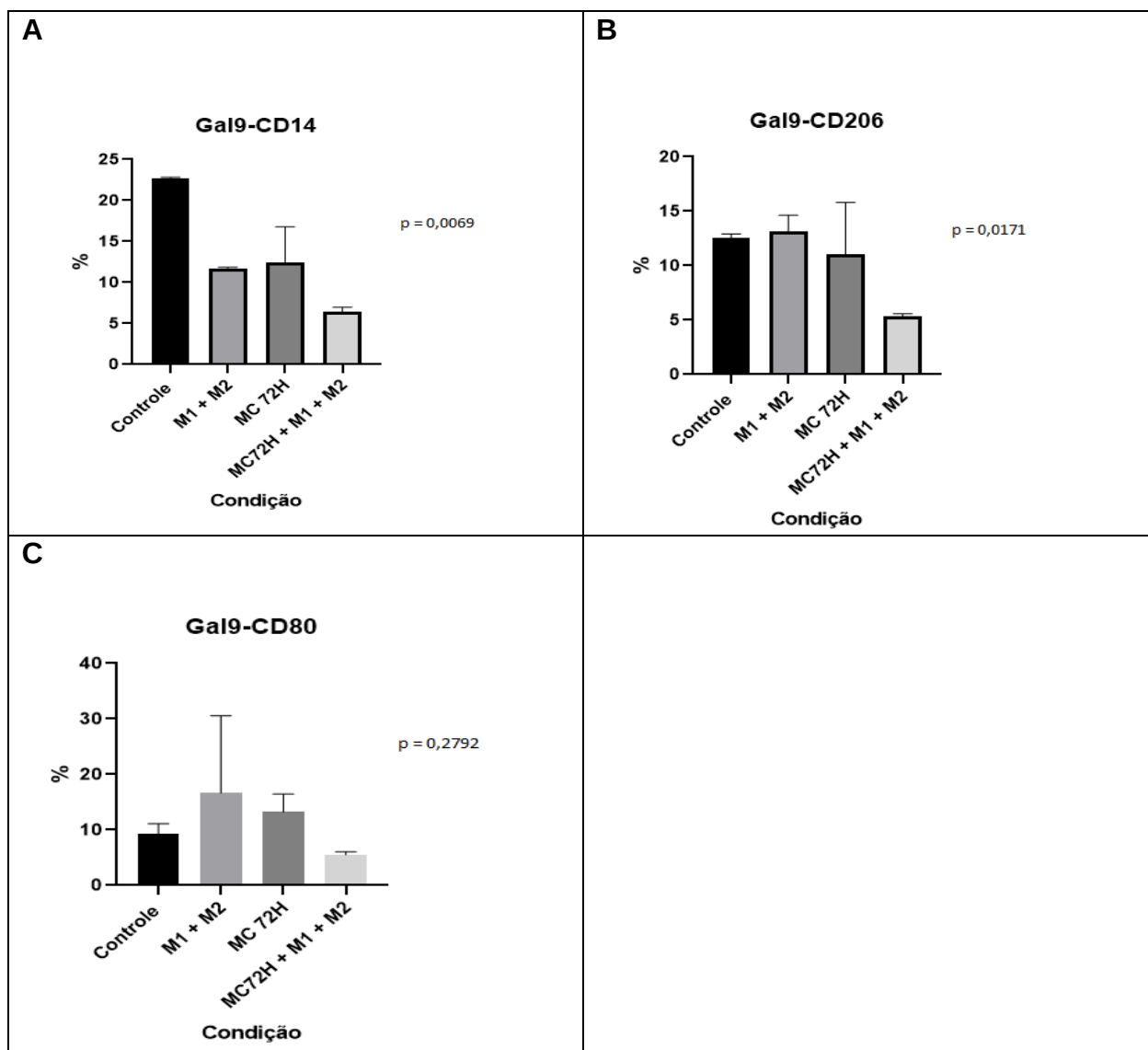


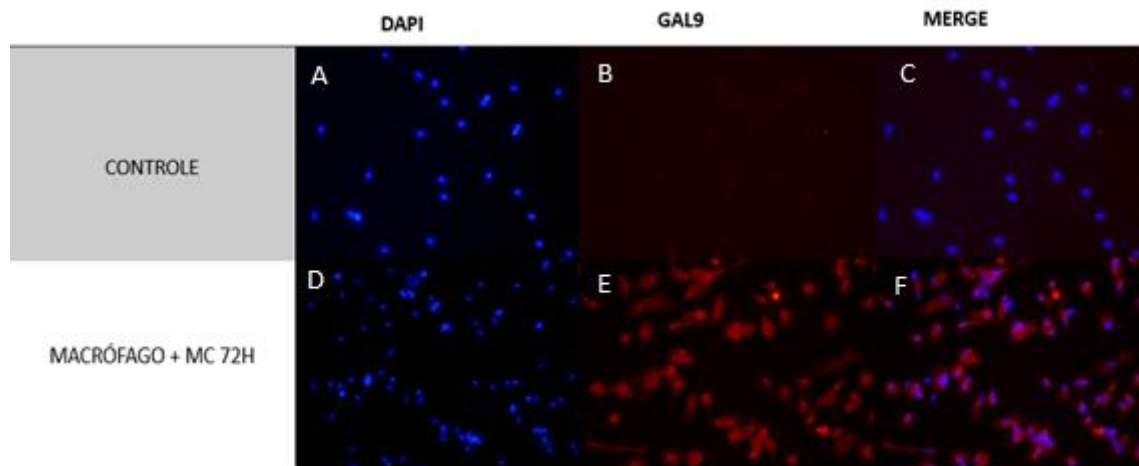
Figura 7: Efeito do meio condicionado sobre a expressão intracelular de Gal-9 na linhagem AGS (estatística). A, B e C representam a expressão de galectina-9 em monócitos, macrófagos M2 e macrófagos M1, respectivamente.



6.7 Avaliação da expressão celular de Gal-9, na linhagem KATO III, por imunofluorescência

Para a avaliação da expressão celular de galectina-9, identificamos as distinções a partir da coloração obtida ao microscópio. Na figura 8, verificamos que na condição controle (A, B e C), há pouca galectina-9 celular, evidenciada pelo merge (C) da marcação nuclear com o DAPI (A), com a marcação de galectina-9 (B). Entretanto, na condição com o MC72h da linhagem KATO III (D, E e F) há uma maior expressão celular de galectina-9, e o merge (F) entre a marcação nuclear (D) e a marcação de galectina-9 (E) nos revela que a expressão da galectina-9 realmente se dá pelas células estimuladas com o MC72h, e não por algum outro fator.

Figura 8: Efeitos do MC72h sobre a expressão celular de galectina-9.



De acordo com os resultados apresentados, os derivados GaTzLapD e de GaTzLap são moléculas promissoras quanto ao potencial de interação da Gal-9 e a atividade anticâncer frente as células tumorais gástricas. Outrossim, o meio condicionado de linhagens de câncer gástrico induz a uma maior polarização de macrófagos, principalmente para a classe M2 dita pró-tumoral, e regula diferentemente a expressão de galectina-9 de maneira dependente do tipo de adenocarcinoma gástrico.

7 DISCUSSÃO

A galectina-9 interage com a imunoglobulina mucina 3 (TIM-3), presente nos linfócitos T, promovendo a sua inativação (RABINOVICH, ILARREGUI, 2009; YANG et al., 2021), assim como interage com a dectina-1, expressa em macrófagos, e essa interação faz com que os macrófagos sejam reprogramados, tornando-se tolerantes ao crescimento do tumor (SAVADKAR et al., 2017). No contexto tumoral, a inibição da galectina-9 possivelmente permitiria com que o sistema imunológico fosse reativado, passando a inibir o crescimento do tumor. Nesse sentido, o presente trabalho buscou investigar a possível interação entre os derivados de galactosídeos com a galectina-9, e a citotoxicidade dos derivados frente às PBMCs e a linhagem tumoral AGS. Bem como avaliou os efeitos da sinalização parácrina de substâncias contidas no MC72h sobre a polarização de macrófagos, e o perfil de expressão da Gal-9 em modelo celular do microambiente tumoral de neoplasias gástricas.

Os resultados de citotoxicidade revelaram que os derivados GaLau e GaLap são tóxicos para as células de indivíduos saudáveis, o que indica que estes derivados não são opções a serem consideradas em estudos futuros, por apresentarem toxicidade às células normais do organismo (OROZCO et al., 2018). GaTzLap, uma molécula muito semelhante à GaLau, apresentou uma toxicidade moderada frente às células não transformadas. Apesar de GaLau e GaTzLap possuírem a mesma estrutura glicosídica e aglicosídica, diferem-se pela inserção de um grupo triazol como ligante entre essas estruturas no derivado GaTzLap, e provavelmente está relacionado com menor toxicidade.

GaTzLau e GaTzLapD não apresentaram toxicidade para as PBMC's. Provavelmente, a não toxicidade por parte do derivado GaTzLapD, se dá pela substituição do acetoxi por uma hidroxila, na estrutura glicosídica, formando um D-galactopiranosídeo. Estudos comprovam que a presença do D-galactopiranosídeo está associada com o potencial inibitório das galectinas (IURISCI et al., 2009). Isso significa que tanto GaTzLau como GaTzLapD podem ser candidatos à alvos terapêuticos promissores, caso seja elucidado a sua toxicidade em células adenocarcinoma gástrico, pois não apresentaram toxicidade significativa para as PBMC's.

A verificação entre a relação de galectina-9 com os cinco diferentes derivados de galactosídeos se dá pelas relações de resistência elétrica das moléculas utilizadas

(NANDI et al., 2020). Os resultados revelaram que o derivado GaTzLapD apresentou maior interação com a galectina-9, provavelmente devido ao seu grupo D-galactopiranosídeo discutido anteriormente. GaLau, GaLap e GaTzLau possuem o mesmo nível de interação, enquanto que GaTzLau foi o derivado que apresentou menor interação com a galectina-9. Fazendo um paralelo com o ensaio de citotoxicidade frente as PBMCs, identificamos que o derivado GaTzLapD além de não ser citotóxico, é a molécula com maior potencial de interação da galectina-9 dentre os inibidores avaliados. GaTzLap também é um derivado que tem a capacidade de inibir a galectina-9 (MANSORUNOV, 2021), mas é moderadamente tóxico, provavelmente por causa da inserção do triazol entre as estruturas glicosídicas e aglicosídicas. E dentre as moléculas não tóxicas para as células, GaTzLau é a que tem o menor potencial inibitório para a galectina-9, revelado pela leitura da plataforma biossensora.

Por conseguinte, avaliamos os efeitos dos derivados de galactosídeos considerados não tóxicos frente às PBMCs, no modelo celular de neoplasia gástrica. O derivado GaTzLapD apresentou uma maior toxicidade frente à linhagem tumoral AGS, provavelmente pelo seu grupo D-galactopiranosídeo, o qual favorece a maior interação com a galectina-9. GaTzLau também teve uma maior toxicidade frente à linhagem neoplásica. No entanto, apesar de resultados promissores dos compostos GaTzLapD e GaTzLau quanto à inibição da galectina-9 e da toxicidade frente às células tumorais (NANDI et al., 2020), novos estudos precisam ser desenvolvidos para avaliar o potencial de inibição desta galectina sobre as células tumorais gástricas e dos macrófagos associados ao tumor. Por fim, os derivados GaTzLapD e GaTzLau inibiram a motilidade da linhagem celular AGS, representando moléculas com potencial terapêutico (MANSORUNOV, 2021). Apesar disso, novos estudos devem ser feitos a fim de elucidarem a questão de quais mecanismos estão envolvidos nessa citotoxicidade por parte dos derivados de galactosídeos.

Os macrófagos são extremamente necessários na progressão tumoral, pois são responsáveis pela secreção de substâncias pró-tumorais, seja inibindo o sistema imune, seja promovendo o crescimento do câncer (DONGQIAN et al. 2019). O câncer é responsável por cooptar células do sistema imune, e dentre elas, destacam-se os macrófagos (MIMURA et al., 2021). Macrófagos associados ao tumor (TAMs) geralmente são do tipo M2 (MIMURA et al., 2021; OYA, HAYAKAWA, KOIKE, 2020; ROJAS et al., 2020), devido às secreções das células neoplásicas. Nesse sentido,

verificamos se há uma maior polarização de macrófagos em monócitos tratados com o MC72h de câncer gástrico. Como também se há distinção entre as classes de macrófagos no microambiente tumoral do adenocarcinoma gástrico e nos controles. Os resultados evidenciaram que há uma maior diferenciação de macrófagos em comparação com os controles, indicando que no meio condicionado das linhagens gástricas há substâncias que induzem a diferenciação de macrófagos (OYA, HAYAKAWA, KOIKE, 2020). E também que há uma polarização distinta dos macrófagos, favorecendo a classe M2, corroborando com as propostas de (ROJAS et al., 2020), provavelmente porque macrófagos M2 secretam substâncias pró-tumorais, como fatores de crescimento. Ademais, TAMs também secretam substâncias imunossupressoras, dentre elas, estão as galectinas (MANSORUNOV et al., 2021).

A galectina-9 é uma molécula secretada tanto por células normais, quanto por células aberrantes, tais como células cancerígenas e TAMs (MANSORUNOV et al., 2021). No contexto do câncer, a secreção dessa molécula está intimamente atrelada à adaptação do tumor ao sistema imunológico (MIMURA et al., 2021). Nesse sentido, uma maior expressão de galectina-9 no microambiente tumoral é diretamente proporcional à taxa de crescimento do câncer (WANG et al., 2018). Com base nisso, decidimos investigar se o meio condicionado das linhagens gástricas é capaz de influenciar na expressão de galectina-9 por parte dos macrófagos, visto que em osteossarcomas e adenocarcinomas pulmonares essa expressão já é elucidada (WANG et al., 2018; LI et al., 2017).

Os resultados revelaram que os fatores secretados pelas células tumorais gástricas induzem a expressão da Gal-9 na linhagem KATO III e reduzem a mesma na linhagem AGS quando comparado ao controle. E com base nisso, evidencia-se que no meio condicionado desta linhagem, há substâncias que induzem a secreção de Gal-9 pelos macrófagos. Mesmo se tratando de um mesmo tipo de câncer, no caso adenocarcinoma gástrico, a doença pode se comportar de formas diferentes, de caso para caso (SUGIMURA, 2016). Nesse sentido, possivelmente o câncer gástrico da linhagem AGS tenha outros mecanismos para evadir-se do sistema imune, um exemplo seria a via PD-L1 (WANG et al., 2018), no entanto não tivemos como avaliar essa questão. Uma das vias mais utilizadas na imunoterapia são as vias PD-L1 e CTL4 (WANG et al., 2018), no entanto, outras vias devem ser levadas em consideração para ampliar o leque terapêutico no combate ao adenocarcinoma

gástrico. Isso nos faz refletir que uma nova opção terapêutica desenvolvida para inibir a via da galectina-9 talvez seja promissora, entretanto, mais estudos devem ser feitos para elucidarem essa questão no contexto do câncer gástrico.

8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- ✓ Os derivados de galactosídeos GaLau, GaLap e GaTzLap não representam moléculas promissoras, pois são tóxicas para as células normais do organismo;
- ✓ Os derivados de galactosídeos GaTzLapD e GaTzLau representam moléculas promissoras quanto ao potencial de inibição da Gal-9 e a atividade anticâncer;
- ✓ Os fatores secretados pelas linhagens celulares de câncer gástrico KATO III e AGS, têm a capacidade de polarizar macrófagos, favorecendo a classe M2;
- ✓ Os fatores secretados pela linhagem celular de câncer gástrico KATO III têm a capacidade de regular positivamente a expressão intracelular de galectina-9;

REFERÊNCIAS

- ALIPOUR, M. Molecular Mechanism of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, 14 set. 2020.
- ARAÚJO, J. M. D. et al. CCR3 antagonist impairs estradiol-induced eosinophil migration to the uterus in ovariectomized mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 1, p. e8659, 2020.
- BROCCO, D. et al. The Role of Dysfunctional Adipose Tissue in Pancreatic Cancer: A Molecular Perspective. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. E1849, 9 jul. 2020.
- CROCI, O. et al. Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. **Cell**, v. 156, n. 4, p. 744–758, fev. 2014.
- FARHOOD, B.; NAJAFI, M.; MORTEZAEI, K. CD8 + cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8509–8521, 22 nov. 2018.
- FIGUEIREDO, C. R. L. V. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: an update. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 3, 2019.
- FUNES, Samantha. Implications of macrophage polarization of autoimmunity. **Immunology**, [s.l.], 154, 2, p. (186-195), junho, 2018.
- GELSOMINO, F. et al. [Gastric carcinoma: an evolutionary scenario.]. **Recenti Progressi in Medicina**, v. 108, n. 3, p. 120–127, 1 mar. 2017.
- GENTEK, R.; MOLAWI, K.; SIEWEKE, M. H. Tissue macrophage identity and self-renewal. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 56–73, 1 nov. 2014.
- IURISCI, I. et al. Synthetic inhibitors of galectin-1 and -3 selectively modulate homotypic cell aggregation and tumor cell apoptosis. **Anticancer Research**, v. 29, n. 1, p. 403–410, 1 jan. 2009.
- JELIC, M. et al. Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 0, n. 0, p. 0, 2019.
- JOHANNES, L.; JACOB, R.; LEFFLER, H. Galectins at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 9, p. jcs208884, 1 maio 2018.
- LI, X. et al. Tim3/Gal9 interactions between T cells and monocytes result in an immunosuppressive feedback loop that inhibits Th1 responses in osteosarcoma patients. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 153–159, 1 mar. 2017.
- LIU, Q. et al. Inverse correlation between Interleukin-34 and gastric cancer, a potential biomarker for prognosis. **Cell & Bioscience**, v. 10, p. 94, 2020.

- LV, R.; BAO, Q.; LI, Y. Regulation of M1-type and M2-type macrophage polarization in RAW264.7 cells by Galectin-9. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 6, p. 9111–9119, 4 out. 2017.
- MANSORUNOV, D. et al. Expression of Immune Checkpoints in Malignant Tumors: Therapy Targets and Biomarkers for the Gastric Cancer Prognosis. **Diagnostics**, v. 11, n. 12, p. 2370, 16 dez. 2021.
- MIMURA, K. et al. Combined inhibition of PD-1/PD-L1, Lag-3, and Tim-3 axes augments antitumor immunity in gastric cancer–T cell coculture models. **Gastric Cancer**, v. 24, n. 3, p. 611–623, 20 fev. 2021.
- NANDI, S. et al. Biosensor platforms for rapid HIV detection. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 98, p. 1–34, 2020.
- NEBBIA, G. et al. Upregulation of the Tim-3/galectin-9 pathway of T cell exhaustion in chronic hepatitis B virus infection. **PloS One**, v. 7, n. 10, p. e47648, 2012.
- NGAMBENJAWONG, C.; GUSTAFSON, H. H.; PUN, S. H. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 114, p. 206–221, 15 maio 2017.
- OROZCO, C. A. et al. Targeting galectin-1 inhibits pancreatic cancer progression by modulating tumor–stroma crosstalk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 16, p. E3769–E3778, 17 abr. 2018.
- OYA, Y.; HAYAKAWA, Y.; KOIKE, K. Tumor microenvironment in gastric cancers. **Cancer Science**, v. 111, n. 8, p. 2696–2707, 1 ago. 2020.
- PERICAY, C. et al. Tratamientos oncológicos em e43assader de unión esofagogástrica43assadodo, presente y futuro. **Cirugía Española**, v. 97, n. 8, p. 459–464, out. 2019.
- QIN, S. et al. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, 6 nov. 2019.
- RABINOVICH, G. A.; ILARREGUI, J. M. Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 144–159, jul. 2009.
- REECE, Jane. et al. **Biologia de Campbell**. 10. ed. [s.l.]: Artmed, 2015.
- ROY, P. S.; SAIKIA, B. J. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian journal of cancer**, v. 53, n. 3, p. 441–442, 2016.
- RUAN, T. et al. A Review of Research Progress in Multidrug-Resistance Mechanisms in Gastric Cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 1797–1807, 2020.
- IMMEDIATE OFFICE OF THE SECRETARY (IOS. **Public Access**. Disponível em: <<https://www.hhs.gov/open/publicaccess/index.html>>.
- STEGMAYR, J. et al. Extracellular and intracellular small-molecule galectin-3 inhibitors. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 18 fev. 2019.
- SONG, Z. et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer. **Tumour**

Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, v. 39, n. 7, p. 1010428317714626, 1 jul. 2017.

SUGIMURA, H. Susceptibility to human cancer: From the perspective of a pathologist. **Pathology International**, v. 66, n. 7, p. 359–368, 1 jul. 2016.

SUN, C.; MEZZADRA, R.; SCHUMACHER, T. N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. **Immunity**, v. 48, n. 3, p. 434–452, 2018.

TEO HANSEN SELNO, A. et al. High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Induces Toll-Like Receptor 4-Mediated Production of the Immunosuppressive Protein Galectin-9 in Human Cancer Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 675731, 2021.

THRIFT, A. P.; EL-SERAG, H. B. Burden of Gastric Cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 3, p. 534–542, mar. 2020.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 4, p. 444–457, 21 fev. 2017.

VOGEL, D. Y. S. et al. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. **Immunobiology**, v. 219, n. 9, p. 695–703, set. 2014.

WALDUM, H. L.; SAGATUN, L.; MJONES, P. Gastrin and Gastric Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 17 jan. 2017.

WAN, L. et al. Galectins in allergic inflammatory diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 79, p. 100925, 1 jun. 2021.

WANG, M.-X. et al. Dectin-1 plays a deleterious role in high fat diet-induced NAFLD of mice through enhancing macrophage activation. **Acta Pharmacologica Sinica**, 10 jun. 2022.

WANG, Y. et al. Association between Tim-3 and Gal-9 expression and gastric cancer prognosis. **Oncology Reports**, 6 ago. 2018.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł. A.; SZUKIEWICZ, D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–19, 2014.

WU, K. et al. Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 4 ago. 2020.

YANG, R. et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 832, 5 fev. 2021.

ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, 9 mar. 2017.

ZENG, D. et al. Tumor Microenvironment Characterization in Gastric Cancer Identifies Prognostic and Immunotherapeutically Relevant Gene Signatures. **Cancer Immunology Research**, v. 7, n. 5, p. 737–750, 6 mar. 2019.

ZENG, D. et al. Tumor microenvironment evaluation promotes precise checkpoint immunotherapy of advanced gastric cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 9, n. 8, p. e002467, 1 ago. 2021.

ZHANG, C. et al. CXCL9/10/11, a regulator of PD-L1 expression in gastric cancer. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 462, 24 abr. 2018.

ZHAO, L. et al. TIM-3: An update on immunotherapy. **International Immunopharmacology**, v. 99, p. 107933, 1 out. 2021.