



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MYLEIDE BIZERRA GUIMARÃES

**GALACTOMANANA DE *Delonix regia* AUMENTA A EXPRESSÃO DE CITOCINAS
E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS HUMANAS DE ADENOCARCINOMA
DUCTAL PANCREÁTICO *IN VITRO*.**

FORTALEZA

2024

MYLEIDE BIZERRA GUIMARÃES

GALACTOMANANA DE *Delonix regia* AUMENTA A EXPRESSÃO DE CITOCINAS
E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS HUMANAS DE ADENOCARCINOMA
DUCTAL PANCREÁTICO *IN VITRO*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G979g Guimarães, Myleide Bizerra.
Galactomanana de *Delonix regia* aumenta a expressão de citocinas e estresse oxidativo em células humanas de adenocarcinoma ductal pancreático in vitro. / Myleide Bizerra Guimarães. – 2024.
78 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.
1. *Delonix regia*. 2. câncer. 3. pâncreas. 4. polissacarídeo. 5. receptor 4 toll-like. I. Título.
CDD 615.1
-

MYLEIDE BIZERRA GUIMARÃES

GALACTOMANANA DE *Delonix regia* AUMENTA A EXPRESSÃO DE CITOCINAS
E ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS HUMANAS DE ADENOCARCINOMA
DUCTAL PANCREÁTICO *IN VITRO*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 27/08/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Com gratidão, dedico este trabalho à Deus, que plantou em meu coração a semente da perseverança, me capacitou e fortaleceu diante de cada desafio.

À CAPES, pois, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacológica Gastrointestinal (LEFFAG), pela orientação acadêmico/científica, apoio e confiança.

Aos meus amigos Gêssica Oliveira, Paulo Roberto, Lara Mara, Maria Felipe, Klayre Sousa e Thiago Andrade, a minha eterna gratidão! Vocês são a melhor parte dessa experiência. Não compartilhamos apenas protocolos, mas também valores: empatia, respeito, generosidade e responsabilidade. Os conselhos, o amparo e ajuda de vocês foram essenciais para essa conquista.

Ao Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial a Lucyana pela colaboração e suporte técnico.

Ao Núcleo de Estudos de Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI) e a estrutura do Departamento de Morfologia da UFC, fundamentais para execução deste trabalho, em especial a Dra. Conceição da Silva Martins Rebouças.

Ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) e Laboratório Multiusuário do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC, em especial na pessoa da Dra. Aurilene Cajado e Prof. Dr. Roberto César que me acolheram, viabilizando parte dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro e o Laboratório de Química (LAQUI) da FAFIDAM/UECE por cederem gentilmente a galactomanana utilizada nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza, pela colaboração com os recursos de docking molecular.

Ao Dr. Álvaro Franco, Dra. Fabrícia Jácome e todos do LEFFAG, que direta ou indiretamente colaboraram em alguma etapa da execução desta pesquisa.

Ao João Afonso, por me incentivar em todos os meus projetos profissionais e na vida.

Aos meus pais, Marcos Evete e Marileide Guimarães.

RESUMO

O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) representa 90% das neoplasias malignas do pâncreas. Cerca de 80% dos pacientes apresentam a doença avançada ou metastática e os tumores possuem mecanismos de multirresistência aos quimioterápicos utilizados atualmente. Os desafios no tratamento do PDAC reforçam a necessidade da prospecção de novas moléculas com potencial antitumoral. A galactomanana extraída das sementes de *Delonix regia* (GM-DR) tem efeito citotóxico sobre células humanas de PDAC. Mas, ainda não foi esclarecido como GM-DR interage com essas células e se há repercussões sobre o perfil inflamatório e status redox das células cancerígenas. Neste trabalho, investigamos o efeito de GM-DR sobre a expressão de mediadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo em 2 linhagens de células PDAC *in vitro*. Após o tratamento de células BxPC-3 e PANC-1 com GM-DR (700 µg/ml) por 24h, foi avaliada a expressão de mediadores pró-inflamatórios por Western Blot (IL1 β , IL6, TNF- α , NF- κ B p65, COX-2). Também avaliamos marcadores indiretos de estresse oxidativo pelo consumo de GSH e expressão da enzima iNOS. GM-DR induziu aumento significativo de TNF- α , IL-1 β , IL-6 apenas em células BxPC-3. GM-DR aumentou NF- κ B p65 em PANC-1; embora BxPC-3 apresente níveis basais mais elevados de p65, foi expresso igualmente antes e depois do tratamento experimental. Diferente dos outros mediadores, GM-DR diminuiu a expressão de COX-2 em BxPC-3. GM-DR também aumentou o consumo de GSH em BxPC-3, mas não alterou a expressão de iNOS. Avaliamos o receptor TLR4 como alvo potencial de interação com as células de PDAC. Embora haja expressão constitutiva do receptor em ambas as linhagens, GM-DR aumentou a intensidade de imunofluorescência e expressão do TLR4 apenas em BxPC-3. Utilizamos recursos de docking molecular para avaliar a afinidade de formação de complexo receptor-ligante entre GM-DR e TLR4. Descobrimos que GM-DR tem uma forte afinidade de ligação no sítio ativo do receptor TLR4, podendo ligar-se firmemente na mesma cavidade do LPS. Embora não tenhamos elucidado totalmente os mecanismos pelos quais GM-DR produz efeitos biológicos intracelulares sobre células de PDAC, os resultados aqui descritos, sugerem que a GM-DR parece ativar a resposta inflamatória clássica de polissacarídeos via TLR4 em células BxPC-3.

Palavras-chave: *Delonix regia*; câncer; pâncreas; polissacarídeo; receptor 4 toll-like.

ABSTRACT

GALACTOMANAN FROM *Delonix regia* INCREASES THE EXPRESSION OF CYTOKINES AND OXIDATIVE STRESS IN HUMAN ADENOCARCINOMA CELLS PANCREATIC DUCTAL *IN VITRO*.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) represents 90% of malignant neoplasms of the pancreas. Around 80% of patients have advanced or metastatic disease and the tumors have mechanisms of multiresistance to currently used chemotherapy drugs. The challenges in treating PDAC reinforce the need to search for new molecules with antitumor potential. Galactomannan extracted from *Delonix regia* seeds (GM-DR) has a cytotoxic effect on human PDAC cells. However, it has not yet been clarified how GM-DR interacts with these cells and whether there are repercussions on the inflammatory profile and redox status of cancer cells. In this work, we investigated the effect of GM-DR on the expression of pro-inflammatory mediators and oxidative stress in 2 PDAC cell lines *in vitro*. After treating BxPC-3 and PANC-1 cells with GM-DR (700 µg/ml) for 24h, the expression of pro-inflammatory mediators was evaluated by Western Blot (IL1 β , IL6, TNF- α , NF- κ B p65, COX-2). We also evaluated indirect markers of oxidative stress through GSH consumption and expression of the iNOS enzyme. GM-DR induced a significant increase in TNF- α , IL-1 β , IL-6 only in BxPC-3 cells. GM-DR increased NF- κ B p65 in PANC-1; although BxPC-3 shows higher basal levels of p65, it was expressed equally before and after experimental treatment. Different from other mediators, GM-DR decreased COX-2 expression in BxPC-3. GM-DR also increased GSH consumption in BxPC-3, but did not alter iNOS expression. We evaluated the TLR4 receptor as a potential target for interaction with PDAC cells. Although there is constitutive expression of the receptor in both lines, GM-DR increased the immunofluorescence intensity and TLR4 expression only in BxPC-3. We used molecular docking resources to evaluate the affinity of receptor-ligand complex formation between GM-DR and TLR4. We found that GM-DR has a strong binding affinity at the active site of the TLR4 receptor, and can firmly bind to the same pocket as LPS. Although we have not fully elucidated the mechanisms by which GM-DR produces intracellular biological effects on PDAC cells, the results described here suggest that GM-DR appears to activate the classical polysaccharide inflammatory response via TLR4 in BxPC-3 cells.

Keywords: *Delonix regia*; cancer; pancreas; polysaccharide; toll-like receptor 4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-Taxa bruta de Incidência por 100.000 habitantes, ambos os sexos, idade [0-74 anos], em 2022.....	14
Figura 2	- Estimativa de incidência de câncer de pâncreas no mundo, em ambos os sexos, de 0 a 85 anos	15
Figura 3	-Imagem de macroscopia e histologia de um tumor de adenocarcinoma ductal pancreático.....	17
Figura 4	- Progressão da carcinogênese em adenocarcinoma ductal pancreático.....	18
Figura 5	-Estrutura básica de galactomananas	26
Figura 6	- <i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook)	27
Figura 7	- Cascata intracelular pró-inflamatória induzida por polissacarídeos via ativação do receptor toll-like 4	30
Figura 8	-Células em cultivo: BxPC-3 e PANC-1	34
Figura 9	-Expressão de TNF-α em células BxPC-3	42
Figura 10	-Expressão de TNF-α em células PANC-1	43
Figura 11	-Expressão de IL-1 em células BxPC-3	44
Figura 12	-Expressão de IL-1 em células PANC-1	44
Figura 13	-Expressão de IL-6 em células BxPC-3	45
Figura 14	-Expressão de IL-6 em células PANC-1	46
Figura 15	-Expressão de NF-κB p65 em células BxPC-3	47
Figura 16	-Expressão de NF-κB p65 em células PANC-1	47
Figura 17	-Expressão de COX-2 em células BxPC-3	48
Figura 18	-Expressão de iNOS em células BxPC-3	49
Figura 19	-Imunofluorescência de TLR4 em células BxPC-3	51
Figura 20	-Imunofluorescência de TLR4 em células PANC-1	52
Figura 21	-Expressão de TLR4 em células BxPC-3	53

Figura 22 -Expressão de TLR4 em células PANC-1	54
Figura 23 -Acoplamento de GM-DR ao TLR4 na mesma cavidade do Lipopolissacarídeo (LPS)	54
Figura 24 -Tipos de interações GM-DR - TLR4 em visualização 2D.....	
Figura 25 -Visão estéreo da ligação GM-DR.....	
Figura 26 Modelo hipotético de interação da GM-DR com células BxPC-3	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Consumo de glutathiona reduzida (GSH) em células BxPC3	50
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Painel de mutações características de diferentes linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático	18
Tabela 2	Efeitos antitumorais atribuídos à polissacarídeos	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BxPC-3	Linhagem celular de adenocarcinoma ductal pancreático humano
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EtOH	Etanol
GSH	Glutathiona Reduzida
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP	Iodeto de Propídeo
IF	Imunofluorescência
IPMNs	Neoplasias Mucinosas Papilares Intraductais
KRAS	Gene oncogene Kirsten Ras
GM-DR	Galactomanana de <i>Delonix regia</i> com reduzida massa molar de pico
MCNs	Neoplasias Císticas Mucinosas
MiaPaCa2	Linhagem Celular de Adenocarcinoma Ductal Pancreático Humano
Mpk	Massa Molar de Pico
MTT	3'-[4,5-dimethylthiazol-2yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nec-1	Necrostatina-1
NF κ B	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NSA	Necrosulfonamida
PANC-1	Linhagem Celular de Adenocarcinoma Ductal Pancreático Humano
PanIN	Neoplasia Intraepitelial Pancreática
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão Salina Fosfato
PDAC	Adenocarcinoma de Ducto Pancreático Humano
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI3K δ	Fosfatidilinositol kinase 3
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por Minuto

TLR2	Do inglês “toll-like receptor 2”, humano
TLR4	Do inglês “toll-like receptor 4”, humano
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Z-vad-FMK	Inibidor de caspase
WB	Western Blotting

LISTA DE SÍMBOLOS

©	Copyright
®	Marca Registrada
™	Trademark
Å	Símbolo do angstrom, unidade de comprimento equivalente a 0,1 nanômetro
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
kDa	kilodalton
atm	Unidade utilizada para pressões no Sistema Internacional de Unidades.
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
<	Menor que
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ml	mililitro
M	Mol
%	Percentage

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Epidemiologia do câncer de pâncreas	14
1.2	O Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC)	16
1.3	Farmacoterapia atual e os desafios no tratamento de PDAC	19
1.3.1	Resistência de células PDAC à agentes antineoplásicos.....	20
1.3.2	Inflamação e estresse oxidativo na terapia do câncer	22
1.4	O que são galactomanas?	26
1.4.1	Galactomanana de <i>Delonix regia</i> (GM-DR)	27
1.5	Ativação do receptor Toll-like 4 por polissacarídeos	29
1.6	Papel dos receptores TLR4 na inflamação e ativação imunológica contra o câncer	31
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Linhagens de células humanas	34
4.2	Condições de cultivo	34
4.3	Obtenção da galactomanana de <i>Delonix regia</i> (GM-DR)	35
4.3.1	Aquisição e registro das sementes	35
4.3.2	Extração da GM-DR livre de resíduos proteicos	35
4.3.3	Redução do peso molecular da galactomanana de <i>Delonix regia</i>	36
4.3.4	Diluição de GM-DR para o tratamento experimental	36
4.4	Expressão de proteínas por Western Blotting	37
4.5	Avaliação da expressão do receptor TLR4 por imunofluorescência	38
4.6	Consumo de glutathiona reduzida – GSH	39
4.7	Docking molecular	40
4.8	Análise estatística	41
5	RESULTADOS	42

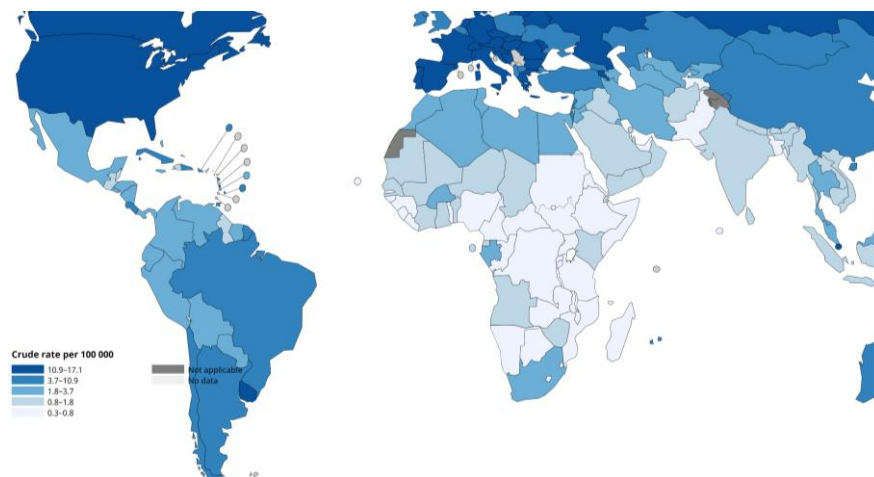
5.1	Efeito do tratamento com GM-DR sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em células de Adenocarcinoma Ductal Pancreático (PDAC) <i>in vitro</i>	42
5.2	Marcadores indiretos de estresse oxidativo em células PDAC tratadas com GM-DR.....	49
5.3	Expressão de TLR4 em Células BxPC-3 e PANC-1 tratadas com GM-DR.....	50
5.4	Análise do acoplamento molecular: GM-DR e receptor TLR4.....	54
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de pâncreas

Nos últimos 25 anos, a carga global das neoplasias malignas do pâncreas mais do que dobrou e a doença está hoje entre as principais causas de morte por câncer no mundo (klein, 2021). Segundo dados do Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN), que monitora a incidência e mortalidade por câncer em todos os continentes, no ano de 2022 foram registrados 510.992 casos da doença, sendo mais incidente na Ásia, Europa e América do Norte, como mostra a Figura 1 (GLOBOCAN, 2022).

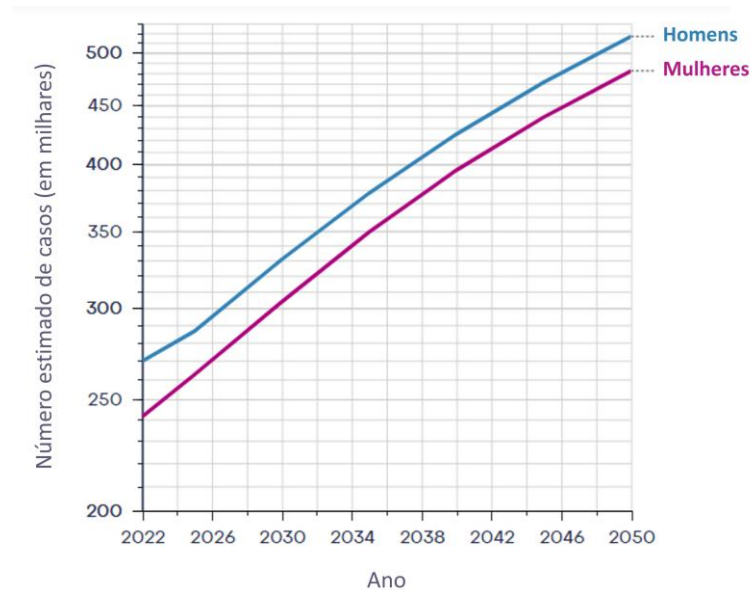
Figura 1 –Taxa bruta de Incidência por 100.000 habitantes, ambos os sexos, de 0 a 74 anos, em 2022



Fonte: Global Câncer Observatory, 2022.

Embora não seja mencionado como um dos tumores mais prevalentes na população, a incidência de neoplasias malignas do pâncreas deve dobrar até o ano de 2050 (Figura 2). Esses dados são alarmantes do ponto de vista epidemiológico visto que essa é uma doença que está associada à alta taxa de mortalidade. As neoplasias malignas do pâncreas, com 467.409 óbitos, foram responsáveis por 4,8% de todas as mortes causadas por câncer no mundo, excluindo câncer de pele não melanoma. (GLOBOCAN, 2022).

Figura 2 – Estimativa de incidência de câncer de pâncreas no mundo, em ambos os sexos, de 0 a 85 anos, até 2050



Fonte: Adaptado de Global Câncer Observatory, 2022.

Sabendo que o risco de desenvolver câncer de pâncreas aumenta com a idade e raramente acomete indivíduos com menos de 40 anos, acredita-se que o envelhecimento populacional tenha contribuído para uma maior incidência (klein, 2021). Ademais, também justifica a perspectiva de aumento de novos casos desse tipo de câncer o aumento da exposição aos fatores risco modificáveis como: tabagismo, consumo excessivo de álcool, baixo consumo de fibras, frutas, vegetais e carnes magras. (Sung *et al.*, 2021; Wild; Weiderpass; Stewart, 2020); E a prevalência de doenças crônicas como obesidade, diabetes tipo 2 e pancreatite crônica (klein, 2021).

O cenário no Brasil, reflete o panorama mundial, com incidência crescente, estima-se 10.980 novos casos para cada ano do triênio de 2023 a 2025, sendo 5.290 em homens e 5.690 em mulheres. E a mortalidade associada à doença, em 2020, foi responsável por 11.893 óbitos, sendo 5.882 óbitos entre homens e 6.011 entre mulheres (INCA, 2020).

O câncer de pâncreas pode acometer as porções endócrinas ou exócrinas do órgão, porém, cerca de 95% dos tumores afetam componentes exócrinos (Chen *et. al.*, 2021). O subtipo histológico mais frequente é o objeto de estudo deste trabalho: O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), que representa mais de 90% de todas as neoplasias malignas do pâncreas (Grant; Hua; Singh, 2016).

Os casos de PDACs costumam ser diagnosticados em fases mais tardias da doença, com metástases proximais e à distância, diminuindo as chances de sucesso no tratamento; O que contribui para a letalidade inerente ao PDAC. No momento do diagnóstico, apenas 10-15% dos pacientes com PDAC têm tumores considerados aptos à ressecção curativa (Kolbeinsson *et al.*, 2023). As razões para o diagnóstico da doença avançada são multifatoriais, mas destaca-se o fato dos sintomas serem inespecíficos e a proximidade do pâncreas com vasos sanguíneos que facilita a evasão de células cancerígenas (McGuigan *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços na medicina e farmacologia do câncer, além do diagnóstico tardio, as terapias utilizadas em pacientes com tumores PDAC ainda apresentam eficácia reduzida. Por isso, a doença está associada à alta taxa de letalidade e a sobrevida global estimada para pacientes que apresentam neoplasias pancreáticas é inferior a 5 anos (Kolbeinsson *et al.*, 2023). A incidência crescente e os baixos números de sobrevivência ressaltam a necessidade do desenvolvimento de métodos de rastreio da doença, desenvolvimento de novos agentes farmacológicos e seus sistemas de distribuição (McGuigan *et al.*, 2018).

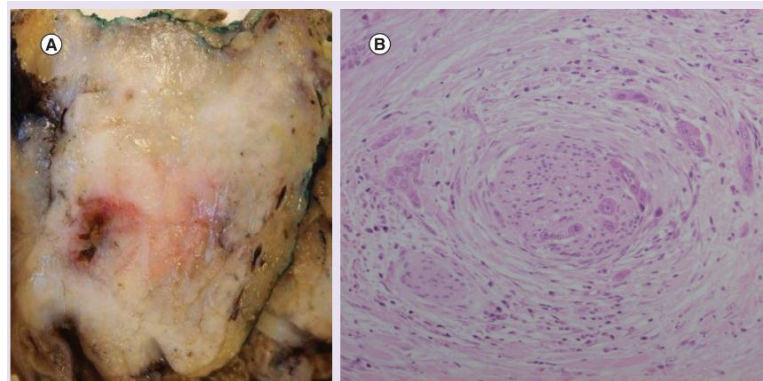
1.2 O adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)

O PDAC acomete o pâncreas exócrino, que compreende a maior porção do órgão e engloba as células acinares e uma rede complexa de ductos pancreáticos (Hart; Conwell, 2017). Henry e col. (2019) descreveram a porção exócrina e o sistema de ductos pancreáticos: O ducto pancreático principal, ou “ducto de Wirsung”, conecta a cauda à região do ducto biliar comum, perpassando todo o órgão; nos ácinos, estão as células acinares, produtoras de enzimas, dispostas em torno do lúmen central e envoltas por tecido conjuntivo e capilares. Também são descritos ductos intercalados aos ácinos, ductos intralobulares e interlobulares. Sendo os ductos intercalados e o ducto principal revestidos por epitélio colunar e células produtoras de muco (Henry *et al.*, 2019).

A origem dos tumores é marcada pela ativação de pró-oncogenes ou pela inativação de genes supressores de tumor e as células cancerígenas apresentam alterações fisiológicas que impulsionam o crescimento das neoplasias: autossuficiência de sinais de crescimento, perda de sinais inibitórios de crescimento, resistência à morte celular apoptótica, potencial de replicação ilimitado, angiogênese e capacidade de invadir e metastizar (Hanahan e Weinberg, 2000).

Histologicamente, é uma característica marcante dos tumores PDACs o estroma desmoplásico, com fibrose proeminente, como mostra a Figura 3. Segundo Ansari e col. (2016), estima-se que o estroma representa 80% do volume tumoral; e é composto por células estreladas pancreáticas, infiltrando de células imunes e uma densa matrix extracelular. As interações entre as células cancerígenas pancreáticas e as células do microambiente tumoral impulsionam o crescimento tumoral, imunossupressão e quimioresistência (Ansari *et al.*, 2016).

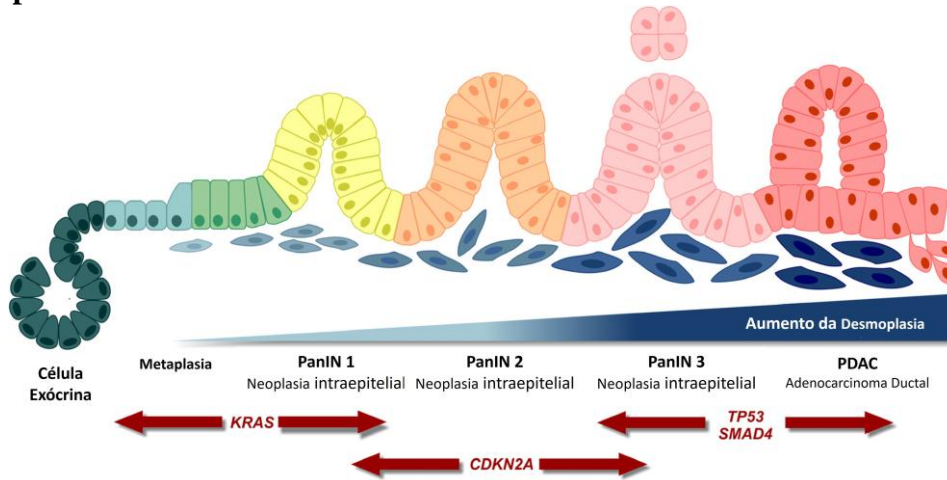
Figura 3 – Imagem de macroscopia e histologia de um tumor de adenocarcinoma ductal pancreático (A) macroscopia (B) histologia



Fonte: Ansari e colaboradores, 2016.

O PDAC surge a partir de lesões pré-cancerosas não invasivas, descritas na literatura como: Neoplasias intraepiteliais pancreáticas (PanIN) e neoplasias mucinosas papilares intraductais (IPMNs). Durante a carcinogênese as células saudáveis sofrem alterações genéticas características de neoplasias malignas (Figura 4) sendo as mutações do oncogene KRAS e dos genes supressores de tumor CDKN2A, TP53 e SMAD4 os mais frequentemente associadas ao PDAC (Wood *et al.*, 2022).

Figura 4 – Progressão da carcinogênese em adenocarcinoma ductal pancreático



Fonte: Adaptado de Orth e colaboradores, 2019.

Embora exista um perfil genético recorrente, a literatura ressalta a heterogeneidade genética das células tumorais de PDAC. Goecks e col. (2015) usando dados de sequenciamento de exoma e transcriptoma para comparar diferentes linhagens de células PDAC ((MIA PaCa2, HPAC e PANC-1), identificaram entre 6.200 e 7.000 variações no exoma de cada tipo celular. A tabela 1 mostra um painel de mutações características de diferentes linhagens de células humanas de PDAC descritas por Bamford e col. (2004).

Tabela 1 – Painel de mutações características de diferentes linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático

LINHAGEM	HISTOLOGIA	ORIGEM	MUTAÇÃO NO GENE
<u>Panc 1005</u>	Adenocarcinoma	Tumor primário	KRAS TP53
<u>BxPC-3</u>	Adenocarcinoma	Tumor primário	CDKN2A MAP2K4 SMAD4 TP53
<u>Capan-2</u>	Adenocarcinoma	Tumor primário	KRAS
<u>CFPAC-1</u>	Adenocarcinoma Ductal	Metástase, fígado	KRAS SMAD4 TP53
<u>HPAF II</u>	Adenocarcinoma	Metástase, ascite	KRAS CDKN2A TP53
<u>SW 1990</u>	Adenocarcinoma	Metástase, baço	KRAS CDKN2A

Fonte: Adaptado de Bamford e colaboradores, 2004.

Wood e col. (2022), afirmaram que essas diferenças moleculares podem interferir no comportamento celular, como nas respostas ao tratamento e potencial de metástase. Por isso, ao usar linhagens celulares como modelo de pesquisa oncológica, é importante entender as diferenças genótípicas e fenotípicas que cada célula apresenta.

Reforçando a importância de se conhecer o perfil de cada célula para melhorar a compreensão das particularidades de cada linhagem na sua biologia molecular que impulsionam a proliferação celular e modula a resistência à quimioterapia, Arumugam e col. (2009) quando investigaram o padrão de quimiosensibilidade de diferentes linhagens de PDAC, observaram que células BxPC-3 foram sensíveis ao tratamento com Gencitabina, 5-FU e cisplatina; Enquanto, Panc-1 e MiaPaCa-2 foram resistentes aos três quimioterápicos.

Além do diagnóstico tardio, segundo Collisson e col. (2019), essa heterogeneidade das células de PDAC é um fator relevante para a prática terapêutica, pois a variabilidade genética e fenotípica dos tumores, implica em diferentes resultados clínicos e respostas biológicas frente ao tratamento farmacológico.

Outras particularidades dos adenocarcinomas ductais do pâncreas serão descritas na seção seguinte, traçando um paralelo com os desafios enfrentados na terapia desses tumores.

1.3 Farmacoterapia atual e os desafios no tratamento de PDAC

A ressecção cirúrgica dos tumores é o único tratamento curativo para o PDAC, mas infelizmente, cerca de 80% dos pacientes no momento do diagnóstico apresentam doença avançada ou metastática, portanto não são hábilis à cirurgia curativa e fazem uso apenas da quimioterapia (Jiang; Sohal, 2023). Isso enfatiza a importância das outras estratégias terapêuticas para o combate e regressão dos tumores.

Atualmente, a farmacoterapia padrão de primeira linha utiliza o FOLFIRINOX (combinação de 5-fluorouracil, irinotecano e oxaliplatina) ou gencitabina associada ao nab-paclitaxel (paclitaxel ligado à albumina) (Wood *et al.*, 2022). Portanto, para o tratamento de câncer pancreático são mais utilizados agentes alquilantes à base de platina (ex.: cisplatina), antimetabólitos como antagonistas de pirimidinas (ex.:5-fluorouracil, gencitabina) e inibidores de fuso mitótico, como taxanos (ex.:paclitaxel) (Bukowski; Kciuk; Kontek, 2020).

O uso do FOLFIRINOX ou gemcitabina mais nab-paclitaxel embora apresentem melhores resultados em comparação à administração de um único fármaco, por vezes é necessário a interrupção do tratamento de maneira precoce e forçada pela piora do status do paciente relativo aos efeitos da toxicidade (Du; Gu; Li, 2020). Abordagens mais agressivas, regimes multidrogas como o FOLFIRINOX, que está associado à toxicidade de grau 3 ou 4, frequentemente exigem modificações como a redução da dose e outras estratégias para minimizar os efeitos adversos (Jiang; Sohal, 2023). Além da toxicidade significativa, outro desafio enfrentado no tratamento da doença, foi descrito por Orth e col. (2019), que é a resistência quimioterápica à maioria dos fármacos utilizados; um padrão comum de células cancerígenas desse tipo de tumor (Chen *et al.*, 2021).

1.3.1 Resistência de células PDAC à agentes antineoplásicos

O aumento da sobrevida alcançado pelos fármacos utilizados atualmente ainda é modesto e a eficácia limitada, visto que quase todos os pacientes apresentam algum grau de resistência aos quimioterápicos. Por exemplo, muitos tumores PDAC têm fenótipos resistentes à gemcitabina, e apenas 4% dos pacientes sobrevivem quando tratados com monoterapia de gemcitabina por dois anos (Principe *et al.*, 2021).

A multirresistência de células cancerígenas de PDACs aos quimioterápicos envolve fatores relacionados ao microambiente tumoral e alterações metabólicas intracelulares. No caso da gemcitabina, colaboram para sua ineficácia fatores como a perda de uma proteína de transporte chamada hENT1 (transportador de nucleosídeo equilibrado humano 1), pelo aumento de enzimas que metabolizam o fármaco e também pela desregulação de vias de sinalização que favorecem a sobrevivência celular como: AKT, ERK/MAPK, HIF1, SOX2, NFκB e WNT (Principe *et al.*, 2021).

As características do estroma dos tumores PDAC com uma matrix extracelular densa, fibrótica e hipovascular dificultam a entrega dos fármacos. Esses fatores também estão relacionados com a hipóxia, típica de tumores sólidos; porém, no trabalho de Du e colaboradores (2020) o câncer pancreático é citado como o mais hipóxico. Essa hipóxia no ambiente tumoral, além de recrutar células imunossupressoras, pode aumentar a resistência à citotoxicidade dos fármacos pela ação do fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1) que ativa respostas adaptativas garantindo a sobrevivência das células cancerígenas (Du; Gu; Li, 2020).

Na resposta adaptativa à hipóxia, Bid e Bax, conhecidas como proteínas pró-apoptóticas são reguladas negativamente. Paralelamente, ainda pode haver ativação de vias como a da fosfoinositídeo-3 quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) e do fator nuclear kappa-cadeia leve-potenciador de células B ativadas (NFκB), favorecendo a resistência à ação dos quimioterápicos (Du; Gu; Li, 2020).

A resistência apoptótica é um ponto crucial na resistência ao tratamento do PDAC. Sabe-se que a resposta terapêutica da maioria dos agentes quimioterápicos envolve principalmente a indução de morte celular apoptótica, embora também possa envolver outros tipos de morte regulada como necroptose, ferroptose, piroptose e alcalinoptose. A sinalização molecular de morte celular em células cancerígenas é um mecanismo complexo e células PDAC são intrinsecamente resistentes ou adquirem resistência apoptótica (Chen *et al.*, 2021).

Várias particularidades das células cancerígenas de PDAC, como o perfil de mutações genéticas descritas na literatura, justificam a resistência à apoptose. Por exemplo: linhagens com mutações nos genes SMAD4 e TP53 podem regular negativamente a sinalização pró-apoptótica (Modi *et al.*, 2016).

Metade dos tumores de PDAC apresentam mutações do gene da proteína TP53. Em células saudáveis, essa proteína pode induzir a transcrição de genes pró-apoptóticos como BAX e BBC3 (Chen; *et al.*, 2021). Portanto, linhagens celulares com TP53 mutante podem ser mais resistentes à antineoplásicos, como visto no trabalho de Fiorini e col. (2015) onde células PANC-1 mutante TP53 foi mais quimiorresistente à gemcitabina (Chen *et al.*, 2021; Fiorini *et al.*, 2015).

O oncogene KRAS, também exerce papel regulador anti-apoptose. A maioria das células PDACs carregam KRAS mutado. No trabalho de Kang e col. (2018) foi descrito que o silenciamento de KRAS aumentou o efeito antitumoral do tratamento com Gencitabina, induzindo apoptose (Kang *et al.*, 2018).

Segundo Li e col. (2004) a ativação constitutiva da via NFκB em linhagens de células PDAC, favorece a resistência ao efeito de agentes indutores de apoptose, de modo que na inibição dessa via pela ação da curcumina, há aumento da quimiosensibilidade. (Li *et al.*, 2004).

Chang e col. (2002) destacaram ainda o c-FLIPL, como um homólogo de pro-caspase 8, porém sem a ação da protease, superexpresso nas neoplásias malignas pancreáticas, que interfere na ativação da apoptose por competir com pro-caspase 8 (Chang *et al.*, 2022).

Particularmente falando da via extracelular, apesar da presença dos receptores de morte celular, e de vias intactas a jusante, na literatura é descrita a ineficiência na ativação extrínseca de apoptose. Um dos responsáveis por esse efeito é a FAP-1 (fosfatase-1 associada ao Fas), altamente expressa em células tumorais do pâncreas. FAP-1 atrapalha a formação do complexo proteico de sinalização indutor de morte, pois diminui a interação FasL com seu receptor FAS, regulando negativamente a ativação via receptor de membrana (Ungefroren *et al.*, 2001).

De modo semelhante, a expressão do receptor de membrana DcR3 (Receptor Decoy 3) na membrana de células tumorais de PDAC atrapalhando a interação de FasL com receptor FAS, conseqüentemente inibindo a apoptose. Isso porque DcR3 é estruturalmente semelhante aos receptores de morte, mas não possuem o domínio de “morte” (Modi *et al.*, 2016).

Além dos exemplos já mencionados, a sinalização redox e a inflamação, descritos na seção seguinte, afetam a sensibilidade das células cancerígenas à estímulos de morte celular induzidos pelo tratamento.

1.3.2 Inflamação e estresse oxidativo na terapia do câncer

No estudo histológico dos tumores, de acordo com o perfil de linfócitos infiltrantes, um tumor pode ser classificado como tumores quentes ou tumores frios. São considerados imunologicamente "quentes" quando há presença significativa de células T CD8, células T citotóxicas e imunogenicidade preexistente. Já nos tumores "frios", são encontradas poucas células T e imunogenicidade deficiente. Os adenocarcinomas ductais pancreáticos são considerados tumores frios (Du; Gu; Li, 2020).

Por isso, alguns trabalhos experimentais tentaram torná-los imunologicamente ativos para ativar a resposta inflamatória no microambiente tumoral (TME) e atrair células imunes, como células T citotóxicas (Ullman *et al.*, 2022). Em relação a produção de citocinas, Orth e col. (2019) afirmam que as citocinas predominantes nos tumores são interleucinas IL-6, IL-8, IL-10 e IL-35, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e algumas quimiocinas.

Uma citocina comumente estudada em células tumorais é o fator de necrose tumoral (TNF- α) que está envolvido ao mesmo tempo na apoptose e proliferação celular. Segundo

Balkwill (2002) níveis elevados de TNF- α estão associados à efeitos antitumorais, enquanto níveis basais podem favorecer a carcinogênese. Quando produzido em níveis fisiológicos por macrófagos ou células estromais do microambiente tumoral, o TNF- α promove o crescimento tumoral (Anderson; Nakada; Dewitte, 2004). Fajardo e col. (1992), relataram que altas concentrações de TNF- α tem ação antiangiogênica, enquanto baixas concentrações promovem angiogênese. Também está relacionado com essa citocina a produção de outros mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 e IL-6 (Balkwill, 2002; Anderson; Nakada; Dewitte, 2004; Farjado *et al.* 1992; Zidi *et al.*, 2010).

Para entender o efeito citotóxico de TNF- α , é preciso saber que em humanos, existem dois receptores para TNF- α : TNFR-1 expresso em todas as células e TNFR-2 expresso em células imunológicas. O domínio de morte citoplasmática está presente apenas em TNFR-1. Após a ativação desse receptor, domínio de morte associado ao TNFR (TRADD) recruta três proteínas adaptadoras: RIPK1, TRAF-2 e FADD (domínio de morte associado ao FAS).; essa cascata leva à ativação da pró-caspase 8 com desfecho de morte celular (Zidi *et al.*, 2010).

O TNF- α quando modulado em resposta à terapia oncológica, pode aumentar o estresse oxidativo e sensibilizar os tumores à apoptose. Especula-se que células endoteliais dos vasos dos tumores têm maior expressão do receptor TNFR-1 em comparação à células saudáveis, permitindo uma ação do TNF- α mais direcionada à região tumoral. (Van Horsen; Ten Hagen; Eggermont, 2006).

O fator nuclear Kappa B, NF κ B, regula respostas imunes e inflamatórias. “A família NF κ B compreende cinco membros: proteínas p50, p52, p65 (Rel-A), c-Rel e Rel-B” (Giridharan; Srinivasan, 2018). Em especial, NF κ B p65, codificado pelo gene RELA, também conhecido como RelA (homólogo A do oncogene viral da reticuloendoteliase aviária v-rel) tem sido avaliado em muitas pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos contra o câncer, visto que a sinalização de p65 regula positivamente a transativação de genes alvo envolvidos na proliferação celular, produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) enzimas (COX-2, iNOS), quimiocinas e mediadores de apoptose (Liu *et al.*, 2017).

A enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), também é considerada um alvo potencial de quimioterápicos. Isso porque, foi visto que a expressão de COX-2 é aumentada em vários tipos de cânceres humanos. No caso dos tumores pancreáticos, COX-2 foi encontrada significativamente elevada no tecido tumoral em relação ao pâncreas saudável, relataram que COX-2 é expressa diferencialmente em linhagens de células PDAC e que a linhagem BxPC-3

apresentou os níveis basais mais elevados da enzima dentre 8 linhagens testadas (Yip-Schneider *et al.*, 2000).

Na literatura, há evidências de que essa regulação positiva de COX-2 inibe a apoptose, aumenta o potencial metastático e angiogênese (Yip-Schneider *et al.*, 2000). De fato, níveis elevados de COX-2 foram relacionados com pior prognóstico em várias coortes de pacientes com câncer (Fridman, *et al.*, 2012).

Sabe-se que a ação de alguns quimioterápicos pode ativar os chamados “inflamassomas” em células cancerígenas e células mieloides. Esses inflamassomas são complexos proteicos que ativam cascatas inflamatórias, maturação de IL-1 e ativação da caspase 1 importantes para o resultado de morte celular (piroptose ou apoptose) (Zhang *et al.*, 2023).

Portanto, a resposta inflamatória tem um impacto relevante na terapia do câncer e por isso a relação entre inflamação e câncer, da patogênese à terapêutica, é estudada desde o século XIX.

Além da inflamação, outro aspecto de grande importância da terapia contra o câncer é o estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento desproporcional de espécies reativas oxidantes. A produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO); e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) como o óxido nítrico (NO), produzido pela óxido nítrico sintase (NOS), é consequência do metabolismo celular. Embora altos níveis de EROS/ERNS tenham efeito citotóxico, células cancerígenas possuem grande capacidade adaptativa, podendo manter a homeostase redox mesmo em condições de elevada carga oxidativa. As células cancerígenas produzem mais agentes oxidantes, porém toleram concentrações mais altas quando comparadas à células normais (Hayes; Dinkova-Kostova; Tew, 2020).

Para evitar a morte celular por apoptose induzida por danos oxidativos dos EROS/ERNS e manter seu equilíbrio redox, as células de adenocarcinoma ductal pancreático e outros tipos de câncer, aumentam suas defesas antioxidantes, como pela biossíntese de glutathiona reduzida (GSH) (Modi *et al.*, 2016).

No contexto das defesas antioxidantes enzimáticas, a glutathiona reduzida (GSH) é uma das principais moléculas não catalíticas que eliminam EROS/ERNS, pois participa da reação de redução dos níveis de H_2O_2 pela glutathiona peroxidase. Condições de estresse oxidativo, resultam portanto, em o consumo de GSH. Curiosamente, células cancerígenas

frequentemente apresentam níveis aumentados de GSH (Hayes; Dinkova-Kostova; Tew, 2020).

Muitos tumores expressam altos níveis da enzima iNOS, que é a isoforma que mais gera ON. O óxido nítrico é um ERNS sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina. Existem três isoformas conhecidas de NOS: nNOS neuronal, eNOS endotelial e iNOS induzível (Vannini; Kashfi; Nath, 2015). No câncer, o ON desempenha um duplo papel a depender dos níveis desse agente oxidante. ON pode reagir com radicais de oxigênio e formar peroxinitrito que culmina na nitrosilação de proteínas sinalizadoras. Essa sinalização nitrosativa em células tumorais pode favorecer a proliferação, metástase e resistência ao tratamento (Glynn *et al.*, 2010). A morte celular apoptótica e necrótica podem ocorrer pela ação do peroxinitrito da via peroxidação lipídica, oxidação de cisteína e também por nitrosilação de proteínas (LI *et al.*, 1991).

A resposta transcricional antioxidante acontece em níveis limiares distintos de EROS/ERNS, de maneira dependente da coexistência de outros fatores como hipóxia, inflamação ou danos ao DNA. O principal regulador dessa transcrição antioxidante é o fator nuclear derivado de eritróide 2 (NRF-2). Mas, é interessante que NRF-2 pode ser antagonizado em condições em que há superexpressão de NFkB p65, tornando assim as células mais suscetíveis ao estresse oxidativo (Hayes; Dinkova-Kostova; Tew, 2020).

Sabe-se que o estresse oxidativo é inerente à terapia contra o câncer. A literatura relata que em células tumorais, altos níveis de estresse oxidativo são tóxicos, enquanto níveis baixos podem estar associados à proliferação celular, de modo que a resposta adaptativa ou de morte celular dependente do status redox. A radioterapia, assim como algumas classes de fármacos utilizados na quimioterapia (ex.: Antraciclina, compostos de platina, alquilantes, epipodofilotoxinas e camptotecinas) podem gerar altos níveis de EROS (Ozben, 2007).

Diante disso, é evidente que na investigação de novas moléculas e estratégias terapêuticas deve-se considerar a avaliação de aspectos inflamatórios e oxidantes que impactam sobre o microambiente tumoral e o comportamento das células cancerígenas.

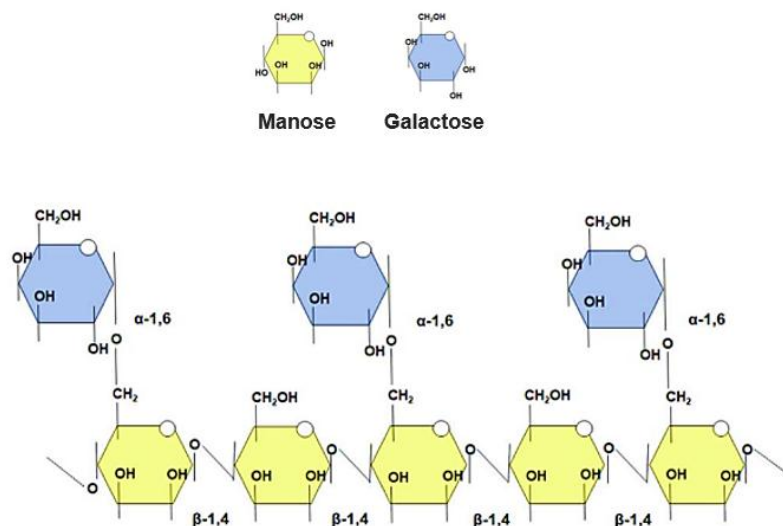
1.4 O que são galactomananas?

Galactomananas são polímeros de hemicelulose, constituintes da parede de células vegetais na forma de polissacarídeos de armazenamento. São extraídas principalmente do endosperma de sementes de leguminosas. A estrutura básica de uma galactomanana é formada por uma cadeia linear de manose com moléculas de galactose em ramificações, como mostra a Figura 5 (Sharma *et. al.*,2021).

Ainda segundo Sharma e col. (2021), soluções e dispersões de galactomananas são mucilaginosas, e também podem ser chamadas mucilagens de sementes ou gomas. Na indústria farmacêutica, gomas naturais já são utilizadas na produção de filmes, nanopartículas, sistemas de matrizes monolíticas, formulações líquidas e em gel, sistemas de administração oral à base de hidrogéis, sistemas multiparticulados e comprimidos.

As galactomananas têm atraído atenção da comunidade científica como uma molécula em potencial, pois além de suas propriedades funcionais, não são consideradas tóxicas, são extraídos de fontes renováveis e passíveis de modificações bioquímicas.

Figura 5– Estrutura básica de galactomananas



Fonte: Adaptado de Sharma e col.,2021.

1.4.1 Galactomanana de *Delonix regia* (GM-DR)

Delonix regia (Bojer ex Hook), conhecida popularmente no Brasil como Flamboyant, é uma árvore da família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. Nativa da Ilha de Madagascar, foi introduzida no Brasil no século XIX, onde se adaptou às condições edafoclimáticas do país (Silva, 2009).

Delonix regia é rica em compostos bioativos e sua composição varia de acordo com cada parte da planta. Os fitoconstituintes das sementes são: Ácidos graxos: ácido linoleico, ácido 7-[2-octaciclopropen-1-il] heptanóico (ácido malvático), ácido 8-[2-octaciclopropen-1-il] octanóico (ácido estercúlico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico; Aminoácidos: trans-3-hidroxi-L-prolina, ácido γ -metilenglutâmico, γ -metilenglutamina; hidrocarbonetos; Esteróis: Stigmasterol, Sitosterol, Fitol, Ergost-4-en-3-ona e Ergost-5-en-3-ol; Carboidratos: galactomanana, proteína bruta e Taninos (Propelargonidina e procianidina) (Modi *et al.*, 2016).

Figura 6– *Delonix regia* (Bojer ex Hook)



Fonte: Elaborada pela autora.

Várias partes da planta já foram estudadas em pesquisas experimentais, compostos isolados das flores e sementes, as folhas e o extrato aquoso do caule. São atribuídas a ela propriedades farmacológicas importantes como ação antioxidante, gastroprotetora, cicatrizante, antiinflamatória, analgésica, dentre outras (Modi *et al.*, 2016).

A capacidade antioxidante de *Delonix regia*, de diminuir radicais livres como OH e ON, geralmente é atribuída aos seus compostos fenólicos (Veiga *et al.*, 2007). Como no estudo de Salem e col (2013) onde o extrato do caule mostrou antioxidante significativa atividade significativa, equivalente ao ácido ascórbico. Shewale e col. (2012) também relacionaram aos fenóis o efeito anti-inflamatório de compostos extraídos de *Delonix regia* em modelo de edema de pata *in vivo*, onde sua ação anti-inflamatória foi significativa, em

comparação com indometacina.

O efeito citotóxico das flores de *Delonix regia* já havia sido descrito por Pusapati e col. (2013) usando ensaio de MTT para avaliar a viabilidade em células de câncer de mama, colo do útero e cólon; e posteriormente Marques (2021) testou a citotóxicidade da galactomanana extraída das sementes de *Delonix regia*, mostrando que a galactomanana das sementes também diminuiu a viabilidade de células de adenocarcinoma pancreático humano, na linhagem BxPC-3.

A galactomanana de *Delonix regia* (GM-DR) é extraída do endosperma das sementes, com características estruturais típicas de galactomananas: elevada massa molar de pico ($6,6 \times 10^5$ g/mol); ligações O-H, C-O de álcool e C-O-C glicosídicas; uma razão galactose e manose na proporção 2,4:1; ausência de proteínas; com moderado teor de umidade (13,78%) e reduzido teor de minerais (0,56%) (Nascimento *et al.*, 2021).

No trabalho de Marques (2021), o tratamento com GM-DR 700 µg/ml e 800 µg/ml por 24h, foi capaz de induzir morte celular significativa na linhagem BxPC-3, mas não em PANC-1 e MiaPaCa. E pela investigação das moléculas envolvidas nas vias da ferroptose, necroptose e apoptose, foi visto que a morte celular em BxPC-3 era dependente de RIPK1 e ativação de caspases 3 e 8, sugerindo que o efeito citotóxico de GM-DR dar-se pela via apoptótica. Além da ação citotóxica nas linhagens cancerígenas, o trabalho relatou efeitos protetores sobre células ácinares *in vitro* e tecido pancreático em dois modelos de pancreatite aguda experimental *in vivo*. De modo que ao mesmo tempo que GM-DR tem ação citotóxica em células cancerígenas, parece proteger células acinares.

Polissacarídeos podem interagir com receptores de membrana e modular respostas celulares (Manero-Rupérez *et al.*, 2020). Acredita-se que polissacarídeos podem ser reconhecidos por receptores tipo-toll (TLRs) em macrófagos, células dendríticas (DCs) e monócitos, por exemplo, para em seguida ativarem a liberação de agentes pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas; constituindo uma resposta imunológica (Yu *et al.*, 2018). Os monossacarídeos Arabinose, Manose e Galactose são os mais frequentemente associados à respostas imunes (Li, *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas, várias atividades biológicas foram atribuídas aos polissacarídeos como: Modulação de respostas imunes, antitumoral, anti-inflamatória (Xie *et al.*, 2020). A Tabela 2 resume alguns exemplos de polissacarídeos com efeito anticancerígeno.

Tabela 2 – Efeitos antitumorais atribuídos à polissacarídeos

EFEITOS ANTITUMORAIS ATRIBUÍDOS À POLISSACARÍDEOS	
Mecanismo	Polissacarídeos
Induz a apoptose de células cancerígenas ou inibe a expressão de oncogenes.	Polissacaropeptídeo de <i>Trametes versicolor</i> ; polissacarídeo de <i>Ganoderma lucidum</i> ; polissacarídeo de <i>Lycium barbarum</i> ; Pectina.
Ativa a resposta imune do hospedeiro.	Polissacarídeo de <i>Lentinula edodes</i> ; polissacarídeo de <i>Schizophyllum commune</i> ; fração D de <i>Grifola frondosa</i> ; polissacaropeptídeo de <i>Trametes versicolor</i> ; polissacarídeo de <i>Astragalus</i> .
Efeito sinérgico junto à fármacos antineoplásicos.	Polissacarídeo de <i>Lentinula edodes</i> ; polissacaropeptídeo de <i>Trametes versicolor</i> ; polissacarídeo <i>Polyporus umbellatus</i> ; polissacarídeo de <i>Ganoderma lucidum</i> ; polissacarídeos de <i>Astragalus</i> .

Fonte: Adaptado de Yu *et al.*, 2018.

A variabilidade e complexidade dos polissacarídeos dificulta a compreensão exata do mecanismo de interação com receptores. Atualmente a teoria mais aceita de como polissacarídeos modulam o sistema imunológico envolve o reconhecimento por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). O PRR mais estudado nesse contexto tem sido o TLR4 (Li, *et al.*, 2022).

1.5 Ativação do receptor toll-like 4 (TLR4) por polissacarídeos

Os humanos expressam 13 tipos de TLRs diferentes. Alguns desses receptores estão localizados na superfície da membrana celular (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 11), exercendo a função de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs) e padrões moleculares associados à morte/danos (DAMPs) (Kumar; Barrett, 2022).

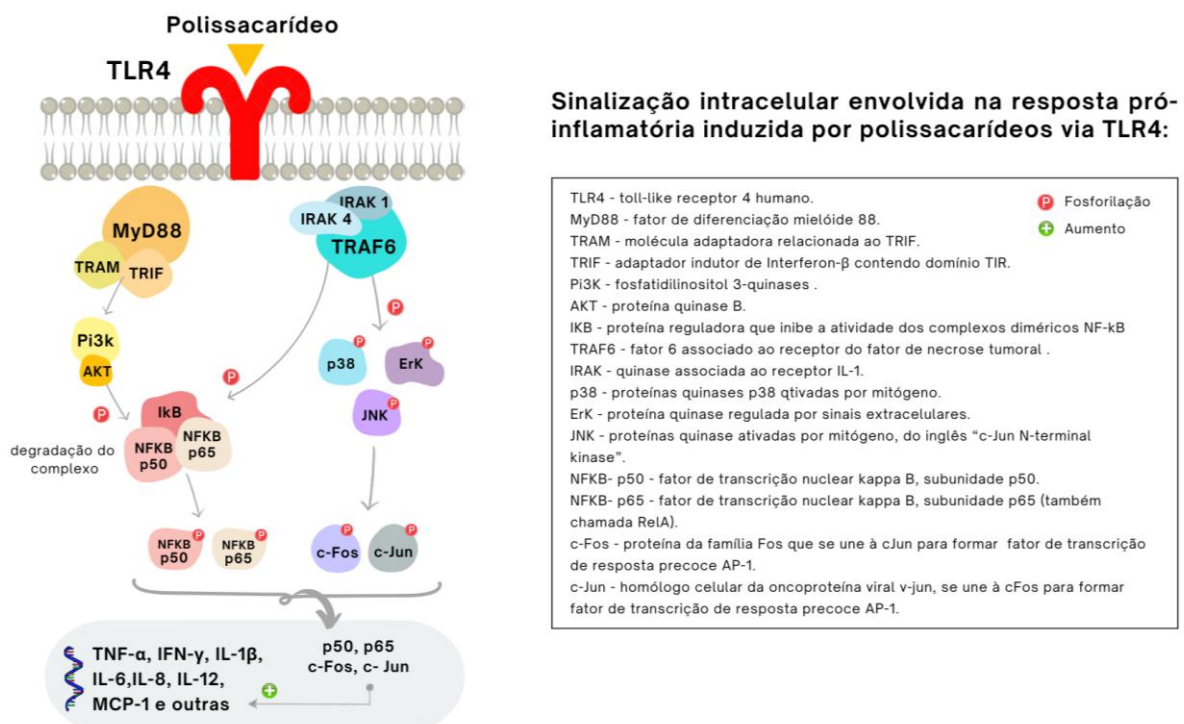
O TLR4 que pertence a família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) reconhece PAMPs: lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, as mananas fúngicas, glicoproteínas virais outros componentes de patógenos (Adams *et al.*, 2017).

Quando ativados, desencadeiam a produção de IL-1 e TNF- α por duas vias distintas: a via dependente do gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a via independente de MyD88, baseada nos efetores TRIF e TRAM. (Adams *et al.*, 2017).

Diversos polissacarídeos exercem funções biológicas (imunes, antitumoral) dependentes de TLR4. Mais de 300 artigos publicados exploram a interação de polissacarídeos (de plantas, fungos, bactérias) com TLR4; como no trabalho de Shoham e col. (2001) onde relataram que a sinalização intracelular em resposta ao polissacarídeo de *Cryptococcus neoformans* era mediada por TLR4 (Li *et al.*, 2022).

Zhang e col. (2016) relataram que a resposta pró-inflamatória de polissacarídeos que se ligam ao TLR4 dar-se principalmente pela produção de TNF- α , espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, IL-6, IL-1, NFKB. Segundo Li e col. (2022) a inflamação mediada por TLR4 seria uma resposta equilibrada e ainda poderia favorecer a apoptose de células tumorais, pela cascata intracelular que envolve a participação de TRAF6 ou Myd88. A cascata molecular envolvida na resposta pró-inflamatória frente à ativação do TLR4 por polissacarídeos foi ilustrada na Figura 7 (Zhang *et al.*, 2016).

Figura 7– Cascata intracelular pró-inflamatória induzida por polissacarídeos via ativação do receptor toll-like 4



Fonte: Adaptado pela autora com base no texto de Li e colaboradores, 2022.

O polissacarídeo-K ligado à proteína (PSK, Krestin®) extraído de cogumelos *Coriolus versicolor*, tradicionalmente usado no tratamento adjuvante para câncer em países asiáticos, é um exemplo de molécula natural com unidade polissacarídea que possui efeito imunomodulador, antitumoral, pois inibe a proliferação celular, induz aumento de TNF- α , IL-6 e induz a apoptose em células de adenocarcinoma pancreático *in vitro*. As respostas biológicas de PSK parecem ser dependentes da ativação de TLR2 e TLR4 (Rosendahl *et al.*, 2012).

1.6 Papel dos receptores TLR4 na inflamação e ativação imunológica contra o câncer

O potencial de agonistas de TLR4 no tratamento do câncer começou a ser explorado em 1891, quando William Coley documentou os efeitos da aplicação de uma mistura de bactérias patogênicas mortas em pacientes com sarcomas inoperáveis (Mccarthy, 2006). Posteriormente, descobriu-se que a molécula que estava ativando a imunidade do hospedeiro contra os tumores era o lipopolissacarídeo ou lipoglicano (LPS), constituinte da membrana de bactérias gram-negativas (Chicoine *et al.*, 2007). Sendo o receptor TLR4 responsável pelo reconhecimento do LPS e ativação da resposta pró-inflamatória, antitumoral (Poltorak, 1998).

Orlacchio e Mazzone (2021) discutiram o potencial da família dos receptores Toll-like (TLRs) como marcadores prognósticos e alvos potenciais no tratamento do câncer, tendo em vista que TLRs são regulados positivamente em diferentes neoplasias e estão associados ao prognóstico da doença; Inclusive, a literatura evidencia a superexpressão desses receptores nas neoplasias no pâncreas que parecem estar ativos durante a inflamação pancreática em resposta aos padrões moleculares associados à danos (DAMPs) (Orlacchio; Mazzone, 2021).

Há evidências de que TLR2 e TLR4 podem estar envolvidos na regressão de neoplasias malignas do pâncreas, porque a expressão desses receptores foi correlacionada com um melhor prognóstico na doença não avançada (Iribarren, *et al.*, 2016). Sabendo que a ação de agonistas de TLRs tem efeitos imunomoduladores, ativando a resposta imune (inata e adaptativa), tem sido explorado na pesquisa oncológica o papel desses receptores em estratégias terapêuticas contra o câncer. A literatura sugere que agonistas de TLRs também podem melhorar a resposta à diferentes modalidades de tratamento sensibilizando células cancerígenas e ativando a imunogenicidade contra os tumores (Iribarren, *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Infelizmente, apesar dos avanços na medicina e farmacologia do câncer, o PDAC continua sendo uma doença letal, com baixa taxa de sobrevivência. A eficácia do tratamento tem resultados muito limitados mesmo fazendo uso da administração conjunta de 2 ou mais antineoplásicos. Os tumores de PDAC apresentam mecanismos de multirresistência aos medicamentos quimioterápicos, alguns por fatores intrínsecos de células cancerígenas e outros relacionados às características do microambiente tumoral dos tumores PDC (Swayden; Iovanna; Soubeyran, 2018). Ademais, o uso de abordagens mais agressivas como o FOLFIRINOX, está associado à toxicidade significativa de grau 3 ou 4 (Jiang; Sohal, 2023).

Os desafios atribuídos ao tratamento desse tipo de tumor, reforçam a necessidade da prospecção de novas moléculas com potencial de ação anticâncer, capazes de driblar os mecanismos de multirresistência ou melhorar a eficiência dos quimioterápicos já utilizados (Bukowski; Kciuk; Kontek, 2020).

Embora alguns trabalhos tenham documentado diversas propriedades terapêuticas atribuídas à *Delonix regia* (ex.: antioxidante, anti-inflamatória, analgésica), o potencial farmacológico da galactomanana isolada das sementes da planta ainda foi pouco explorado. Ensaios *in vitro* mostraram o efeito citotóxico da GM-DR sobre células cancerígenas. A galactomanana diminuiu a viabilidade de células humanas da linhagem BxPC-3 de PDAC, com evidências de que GM-DR possa ativar apoptose em células BxPC-3 (Marques, 2021). Mas, ainda há muitas perguntas a serem respondidas sobre a mecanística desse efeito, como acontece a interação das células com a GM-DR e quais as repercussões sobre o perfil inflamatório e status redox das células cancerígenas (Modi *et al.*, 2016; Veiga *et al.*, 2007; Marques, 2021).

Por isso, acreditamos que os resultados deste trabalho sejam fundamentais para a pesquisa farmacológica da GM-DR e seu potencial terapêutico no contexto dos adenocarcinomas ductais do pâncreas; contribuindo para a prospecção de novas moléculas de origem botânica com potencial antineoplásico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o efeito da galactomanana extraída das sementes de *Delonix regia* (GM-DR) sobre a expressão de mediadores pró-inflamatórios e estresse oxidativo em células humanas de adenocarcinoma ductal pancreático *in vitro*.

3.2 Específicos

- Avaliar o perfil de expressão de mediadores pró-inflamatórios (IL1 β , IL6, TNF- α , NF κ B p65, COX-2) em células BxPC-3 e PANC-1 após o tratamento com GM-DR.
- Investigar o status redox de células PDAC tratadas com GM-DR, por meio de marcadores indiretos de estresse oxidativo: GSH e expressão de iNOS.
- Investigar o receptor TLR4, como alvo potencial de interação de GM-DR com células de adenocarcinoma ductal pancreático pela afinidade de acoplamento molecular e formação do complexo receptor-ligante;
- Avaliar a expressão de TLR4 em células BxPC-3 e PANC-1 antes e depois de serem estimuladas com GM-DR.

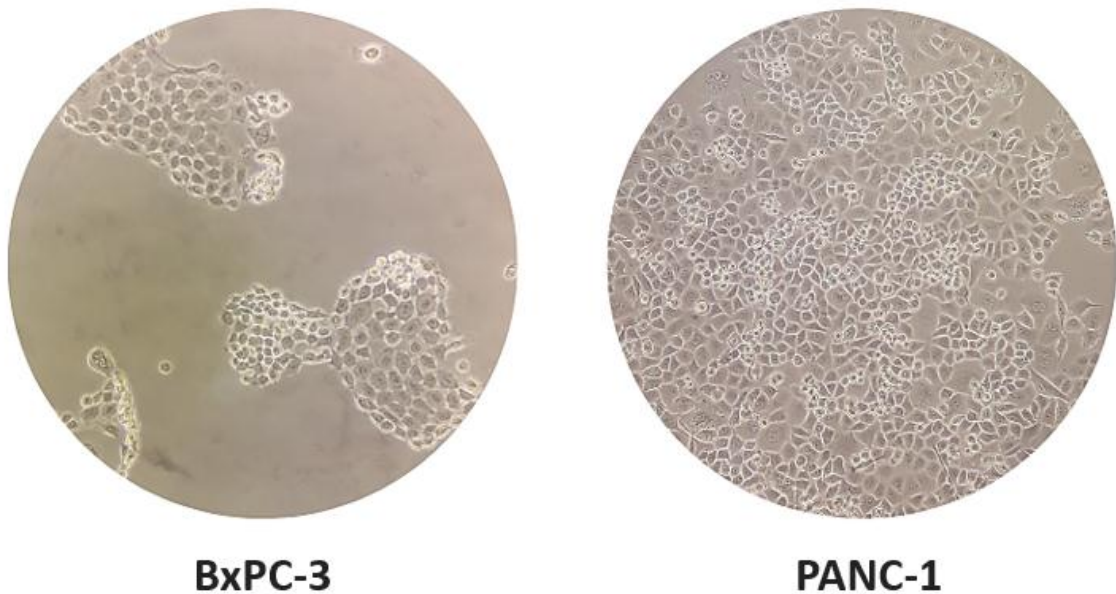
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens de células humanas

Utilizamos duas linhagens de células humanas de adenocarcinoma de ducto pancreático (PDAC), originalmente advindas do banco de células American Type Culture Collection (ATCC®): BxPC-3 (código: CRL-1687TM) e PANC-1 (código: CRL-1469TM).

Ambas as linhagens de células aderentes e morfologia epitelial. A linhagem BxPC-3 é advinda do tecido do pâncreas de uma mulher de 61 anos, com adenocarcinoma pancreático, enquanto PANC-1 do ducto pancreático de um homem branco, de 56 anos, com carcinoma epitelíóide.

Figura 8– Células em cultivo: BxPC-3 e PANC-1



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Condições de cultivo

As células foram cultivadas em frascos estéreis próprios para cultura, mantidos em estufa com atmosfera controlada de 5% de CO₂, a uma temperatura de 37°C. O meio de cultivo foi específico para cada linhagem, de acordo com as recomendações do fornecedor: PANC-1 foi cultivada em meio DMEM F-12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA/ código: D0697) e BxPC-3 em meio RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA/ código: 51536C). Os

meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, código: 12103C) e 100 mg/ml de antibiótico-antimicótico (Gibco™, código: 15240062) contendo ampicilina e estreptomicina.

Ao atingirem uma confluência de 80%, as células eram desprendidas dos frascos utilizando Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco™, código 25300054, Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil), depois lavadas e ressuspensas em meio fresco para serem subcultivadas ou plaqueadas para no tratamento experimental. De acordo com o tipo de protocolo a ser executado o plaqueamento foi feito usando placas de 6, 24 ou 96 poços; contendo $0,5 \times 10^6$, $7,5 \times 10^3$ ou 1×10^3 células por poço, respectivamente. Os procedimentos de manutenção, criopreservação das linhagens, descongelamento e subcultura foram realizados conforme indicação da ATCC®.

4.3 Obtenção da galactomanana de *Delonix regia* (GM-DR)

4.3.1 Registro e aquisição das sementes

A identificação da espécie foi realizada pelo Laboratório de Taxonomia de Angiospermas (Departamento de Biologia/Universidade Federal do Ceará), e a exsiccata da planta está depositada no Herbário Prisco Bezerra da (UFC) sob código: 57951- *Delonix regia* (Bojer ex Hook.); e registro do espécime no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob numeração A54ED41. As sementes de *Delonix regia* utilizadas nesta pesquisa, foram coletadas na zona urbana de Limoeiro do Norte, no estado do Ceará.

4.3.2 Extração da galactomanana livre de resíduos proteicos

A extração e purificação da galactomanana de *Delonix regia* (GM-DR) foram feitas pelo Laboratório de Química na FAFIDAM/UECE (LAQUI), em Limoeiro do Norte-Ce; A galactomanana de *Delonix regia* (GM-DR) isenta de proteína, foi obtida por extração aquosa a frio, seguida por hidrólise alcalina, por procedimentos descritos por Marques (2021). A da GM-DR extraída, foi estimada em $2,5 \times 10^5$ g mol⁻¹, semelhante em ordem de grandeza à GM-DR de Nascimento e col. (2021), obtida pelo mesmo procedimento de extração.

Pelo registro espectroscópico em FT-IR, observou-se as bandas típicas de polissacarídeos: Estiramento O-H na região 3490-3000 cm⁻¹; deformações H-C-H e C-O-H s

na região 1450-1350 cm^{-1} ; a região 1160–950 cm^{-1} , que incluem sinais para vibrações da ligação glicosídica C-O-C e C-O-H de álcool primário. A razão de manose/galactose da GM-DR utilizada foi de 2,39:1 (Marques, 2021).

4.3.3 Redução do peso molecular da galactomanana de *Delonix regia*

Para otimizar a solubilidade da GM-DR, a galactomanana passou pelo processo de sonicação, a fim de reduzir o seu peso molecular. Primeiro foi preparado 60 mL de uma solução de GM-DR a 5% (m/v). Essa solução foi colocada em uma cubeta termostaticada a 45°C, inserida uma sonda acoplada ao sonicador VC505 (Sonics & Material Inc.). A sonicação ocorreu em pulsos (30s ON/30s OFF), de frequência de 20KHz e potência de 500W por 180 minutos.

Após ser submetida ao processo de sonicação, GM-DR com Mpk de $2,5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, apresentou redução de 65,6% de sua massa, sendo obtida a sua versão reduzida em massa molar de pico de $8,6 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$, a qual foi utilizada no tratamento experimental deste trabalho.

GM-DR antes e depois da sonicação, quando submetidas à espectroscopia infravermelha transformada em Fourier (FT-IR), exibiram espectro FT-IR similar, com frequência e intensidade de faixas de absorção semelhantes, mostrando a conservação dos seus grupos funcionais e sua estrutura polissacarídica característica da molécula (Marques, 2021).

4.3.4 Diluição de GM-DR para o tratamento experimental

No preparo do tratamento utilizado no grupo experimental denominado “GM-DR”, primeiro foi feita uma solução a 5% (m/v) de GM-DR, pela dissolução da galactomanana em solução salina estéril. Para isso, a galactomanana foi pesada, depois adicionada a solução salina e deixada em hidratação por 24h em temperatura ambiente.

A partir da solução de 5%, foi feita a segunda diluição, agora com o meio de cultivo específico de cada linhagem, para uma solução de concentração a 0,1%. Como trabalhamos com duas linhagens diferentes, as alíquotas eram preparadas separadamente, de modo que cada célula permanecesse em seu meio de cultivo padrão durante todo o experimento. Portanto, a diluição do tratamento para células PANC-1 foi feita com DMEM F-12 (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA/ código: D0697) e de BxPC-3 em meio RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA/ código: 51536C).

Usando a solução de GM-DR 0,1%, foi feito o preparo das alíquotas de tratamento onde a concentração final era 700 µg/ml. Essa concentração final, que foi testada neste trabalho, havia sido definida previamente em experimentos do nosso grupo de pesquisa, quando foram avaliadas diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 700 e 800 µg/ml) onde o tratamento na concentração de 700 µg/ml de GM-DR produziu a resposta efetiva de citotoxicidade em células tumorais pancreáticas *in vitro*.

4.4 Expressão de proteínas por Western Blotting

Para avaliar a expressão de proteínas por Western Blotting (WB), as células BxPC-3 e PANC-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços: $0,5 \times 10^6$ células/poço. Após 24h, o meio de cultivo foi renovado, quando o grupo experimental denominado “controle” recebeu apenas o meio de cultura padrão e o grupo experimental tratado com “GM-DR” recebeu o meio de cultivo contendo 700 µg/ml de GM-DR. Após o tratamento, as células permaneceram incubadas por 24h dentro da estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

Após o período de incubação, iniciou-se o processo de extração de proteínas e preparo das amostras: O meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com tampão salina fosfato (PBS) a -4 °C. Depois foi adicionado tampão RIPA para extração de proteínas (código: R0278, Sigma-Aldrich) e com um raspador de células de plástico frio, o fundo do poço foi sendo raspado para desprender as células aderidas. Em seguida, o volume no interior de cada poço foi transferido para microtubos e centrifugados durante 20 minutos a 4°C e 16.000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo inibidor de protease (código: S8820, SIGMAFAST™) e colocado imediatamente no gelo.

Antes do WB, foi realizada a normalização da concentração total de proteínas de cada amostra, no qual utilizamos o ensaio de proteína DC™ Protein Assay Kit (código: 5000112, Bio-Rad Laboratories). A partir desse ensaio, definimos o volume específico a ser retirado de cada amostra, para fornecer 50µg de proteína total.

Para serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, foi feito o preparo das amostras adicionando Laemmli Sample Buffer (código: 1610737, Bio-Rad Laboratories) e 2-Mercaptoethanol 14,2M (código: 1610710, Bio-Rad Laboratories); depois foram fervidas em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após eletroforese em gel, as proteínas foram transferidas

para Membranas Immun-Blot PDVF de alta ligação (150-160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) com porosidade de 0,2UM (código: 1620177, Bio-Rad Laboratories).

Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com albumina sérica bovina a 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) por 60 minutos. Em seguida, foram incubadas com anticorpo primário “overnight” sob agitação constante a 4°C. Depois as membranas foram lavadas com PBS e foi realizada uma nova incubação, agora com anticorpo secundário, por 90 minutos. Novamente as membranas foram lavadas e antes da captação das imagens, utilizamos a solução Luminol Clarity™ Western ECL Substrate (código: 1705061, Bio-Rad Laboratories).

Para a imunomarcção das proteínas foram utilizados os seguintes anticorpos: IL-1 Beta (BS-6319R, Thermo Fisher Scientific Inc.); IL-6 (BS-0782R, Thermo Fisher Scientific Inc.); TNF alfa (PA1-40281, Thermo Fisher Scientific Inc.); iNOS (PA1-036, Thermo Fisher Scientific Inc.); TLR-4 (48-2300, Thermo Fisher Scientific Inc.); NF κ B (PA5-27617, Thermo Fisher Scientific Inc.); COX-2 (PA1-37505, Thermo Fisher Scientific Inc.); β -actina (A1978, Sigma-Aldrich®); Anticorpo secundário IgG (H+L) de camundongo (31430, Thermo Fisher Scientific Inc.); Anticorpo secundário IgG anti-coelho, ligado a HRP (7074S, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EUA)

A presença das proteínas foi detectada em experimentos independentes, por quimioluminescência, utilizando o Fotodocumentador ChemiDoc™ Mp Bio-Rad; e a quantificação da expressão de proteína alvo, a partir dos registros do Fotodocumentador, foi feita por meio do software Image Lab™.

4.5 Avaliação da expressão do receptor TLR4 por imunofluorescência

A técnica de Imunofluorescência (IF) foi utilizada para avaliar a expressão do receptor TLR4 nas linhagens BxPC-3 e PANC-1, em dois grupos experimentais: “Controle” e “GM-DR”. As células foram cultivadas sobre lamínulas de 13mm no interior de uma de placa de 24 poços. 24h após o plaqueamento, o meio de cultivo foi renovado, onde o grupo controle recebeu um novo meio de cultivo padrão e o grupo tratado com GM-DR recebeu o meio de cultura contendo 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de GM-DR. Depois as células permaneceram incubadas por 24h dentro da estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

Antes da incubação com os anticorpos, as células foram fixadas. Para isso, primeiro foi descartado o sobrenadante e depois utilizou-se Formaldeído 3% (Sigma-Aldrich®) durante 15 minutos a 37°C. Para permitir a marcação do núcleo das células, também foi feita a etapa de permeabilização da membrana, com Triton X100 a 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) por 15 minutos. Os poços foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e em seguida receberam a solução de bloqueio com albumina sérica bovina 3% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

O anticorpo primário para imunomarcação do TLR4 (código: sc-293072, Santa Cruz Biotechnology, INC.) na diluição de 1:100 foi adicionado após o bloqueio e as células ficaram incubadas “overnight” em temperatura de 4°C. Já a incubação com anticorpo secundário foi feita por 60 minutos em ambiente protegido da luz, usando o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 568 (código: A10037, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na diluição de 1:500. Na sequência, as células foram incubadas por 10 minutos com o intercalante de DNA DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na diluição de 1 µl em 50 ml de PBS.

Finalizadas as marcações, durante a montagem das lâminas, adicionamos ProLong™ Diamond Antifade Mountant (código: P3696, Thermo Fisher Scientific Inc.) a fim de proteger as amostras contra fotodegradação.

As fotomicrografias foram feitas por meio do leitor multimodal Cytation3™ Biotek®. E para análise dos registros de imagens, utilizamos o software Image J (National Institutes of Health, Washington, DC, EUA).

4.6 Consumo de glutathiona reduzida - GSH

Para este ensaio, foi realizado plaqueamento das células BxPC-3 em uma placa de 96 poços, com 1×10^4 células/poço. Após 24h, o grupo controle recebeu apenas o meio de cultura novo e o grupo experimental tratado com GM-DR recebeu o meio de cultivo contendo 700 µg/ml de GM-DR. Durante o tratamento de 24h, as células permaneceram incubadas na estufa em saturação de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

Após esse período, descartamos o sobrenadante. Foi então adicionado 300 µl de PBS gelado e foi realizada a remoção das células pela raspagem e lavagem dos poços. O

sobrenadante foi armazenado em microtubos. A partir dessas amostras coletadas, 40 μl do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foi adicionado 50 μl de água destilada e 10 μl de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugado por 20 minutos em rotação de 5000 rpm à 4°C.

Depois da centrifugação, em uma placa de 96 poços, foram colocados 60 μl do sobrenadante juntamente como a solução de leitura composta tampão TRIS com concentração de 0,4 M, pH 8.9 e com 20 μl 5,5-dithiobis-2-nitro-benzoic ácido (DTNB) e a placa ficou em agitação por 3 minutos. Posteriormente, a absorbância foi medida a 412 nanômetros em espectrofotômetro (Thermo Scientific, modelo BioMate 3S). Expressamos a concentração de GSH em $\mu\text{g}/\text{mg}$ a partir de uma curva padrão (Sedlak; Lindsay, 1968).

4.7 Docking molecular

As estruturas de acoplamento molecular do composto agonista galactomanana (Man(b1-4)[Gal(a1-6)]b-Man) e do receptor TLR4 (PDB ID: 3FXI), determinadas por difração de raios X, com resolução de 3,1 Å, foram obtidas do banco de dados de proteínas RCSB. O TLR4 foi utilizado como estrutura fixa para o método de acoplamento e foi considerado ligado à alguns cofatores, como o fator de diferenciação mieloide 2 (MD-2).

As moléculas de água também foram removidas da simulação de acoplamento usando o Autodock Tools (ADT). Átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína usando a ferramenta de software de acoplamento automático, AutoDock 4.2. Na simulação de docking molecular, o sítio de ligação foi considerado a região mais desejável para o encaixe das extremidades do ligante (galactomanana) ao receptor.

A estrutura 3-D da galactomanana foi projetada com Marvin Sketch (lançamento 2016-1) e a simulação de acoplamento automático foi realizada com ADT para acessar as orientações de ligação e conformações apropriadas da molécula ligante com diferentes inibidores. Um método de algoritmo genético Lamarckiano foi implementado no AutoDock 4.2.

Nos cálculos, as cobranças de Gasteiger foram adicionadas por padrão, as ligações rotativas foram selecionadas pelas ferramentas AutoDock e todas as torções foram autorizadas a girar. Os mapas de grade foram gerados pelo software AutoGrid no qual a grade tinha tamanho $30 \times 30 \times 30$ pontos com espaço padrão de 0,375 Å entre os pontos da grade e cobria

toda a área de ligação favorável. As coordenadas (X, Y, Z) do centro foram (21,3485, -17,4803, 14,285), respectivamente.

O protocolo de acoplamento rígido consistia em 10 algoritmos genéticos independentes e outros parâmetros padrão usados pelo ADT. Os aspectos de ligação da galactomanana e seus correspondentes índices de afinidade de ligação foram considerados para determinar melhores interações moleculares. Os resultados foram visualizados e analisados utilizando ADT, PyMOL e Maestro v.14 (Schrödinger).

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Software GraphPad Prisma 8, pelo qual os dados foram submetidos ao “Teste T de Student”. Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M (erro padrão da média) e diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento com GM-DR sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em células de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) *in vitro*.

A expressão de cada citocina em células de PDAC foi feita em experimentos independentes, com duas linhagens de células humanas, divididas em dois grupos experimentais. O grupo experimental denominado “controle” recebeu apenas o meio de cultura padrão e o grupo experimental tratado com “GM-DR” recebeu o meio de cultivo contendo 700 µg/ml de GM-DR. As imagens representativas de Western Blotting (WB) captadas por quimioluminescência, com 4 amostras de cada grupo, são apresentadas ao lado de sua análise densitométrica correspondente.

Constatamos que células BxPC-3 após o tratamento com GM-DR 700 µg/ml por 24h, expressam 9 vezes mais Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α) em relação ao grupo controle (controle $0,06 \pm 0,01$ vs GM-DR $0,60 \pm 0,08$) como mostrado na Figura 9. Diferente do que foi visto na linhagem BxPC-3, células PANC-1, não apresentaram aumento da expressão de TNF-α (controle $2,52 \pm 0,48$ vs GM-DR $2,33 \pm 0,26$) como mostra a Figura 10

Figura 9– Expressão de TNF-α em células BxPC-3

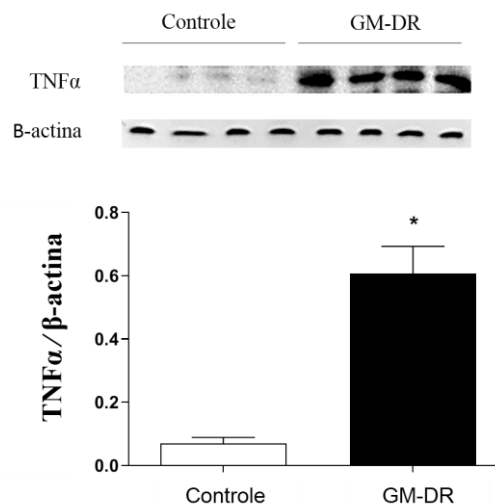


Figura 9: Células BxPC-3 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de TNF-α em 25kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com GM-DR 700 µg/ml

24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

Figura 10– Expressão de TNF- α em células PANC-1

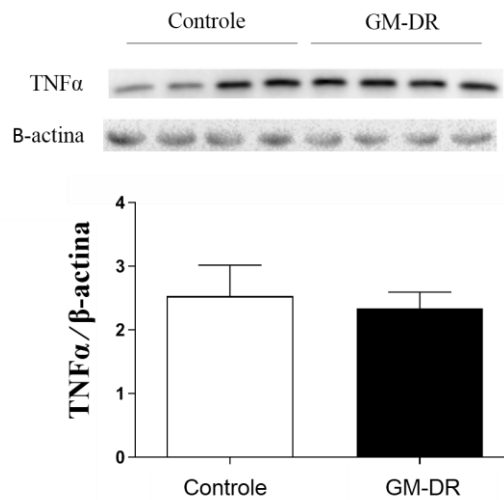


Figura 10: Células PANC-1 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de TNF- α em 25kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com GM-DR 700 μ g/ml 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

A expressão de interleucinas 1 e 6 após a incubação com a galactomanana também apresentou resultados divergentes entre as linhagens. Na linhagem BxPC-3, células tratadas com GM-DR apresentaram expressão de IL-1 β superior aos níveis detectados dessa interleucina no grupo denominado “controle” (controle $0,02 \pm 0,01$ vs GM-DR $0,40 \pm 0,02$) como mostra a Figura 11. Na linhagem de células PANC-1, a IL-1 β estava presente em ambos os grupos (controle $0,36 \pm 0,06$ vs GM-DR $0,54 \pm 0,06$) com aumento não significativo de IL-1 β no grupo tratado em relação ao controle (Figura 12)

Figura 11– Expressão de IL-1 em células BxPC-3

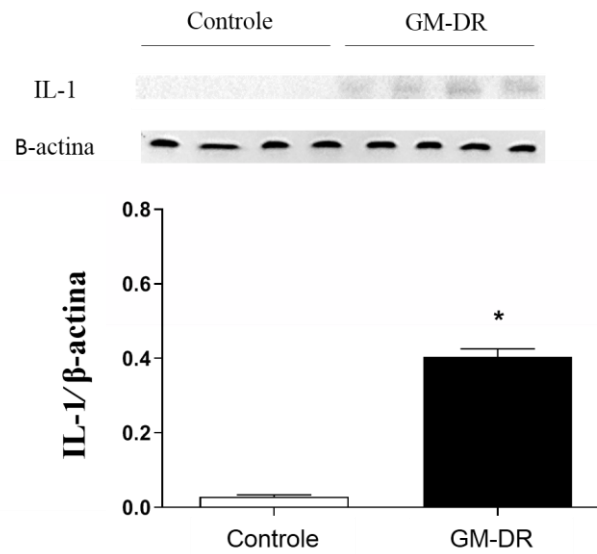


Figura 11: Células BxPC-3 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcagem de IL-1 β em 17 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com GM-DR 700 $\mu\text{g/ml}$ 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

Figura 12– Expressão de IL-1 em células PANC-1

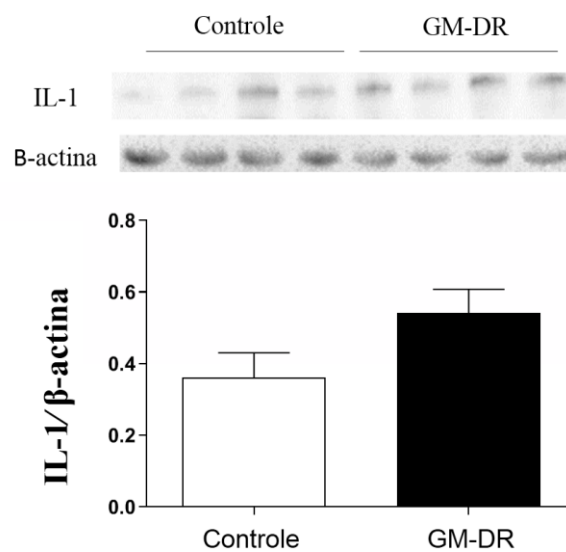


Figura 12: Células PANC-1 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de IL-1 β em 17 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 μ g/ml GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. *p <0,05 GM-DR versus grupo controle.

Células BxPC-3 responderam ao tratamento com GM-DR também com aumento significativo da interleucina 6 (controle $0,09 \pm 0,01$ vs GM-DR $0,57 \pm 0,07$) observado na Figura 13, com mais IL-6 do que as células da mesma linhagem em condições “controle”. E assim como a IL-1, a expressão de IL-6 na linhagem PANC-1 não difere estatisticamente entre os grupos (controle $0,24 \pm 0,03$ vs GM-DR $0,23 \pm 0,03$), como pode ser observado nos resultados contidos na Figura 14

Figura 13– Expressão de IL-6 em células BxPC-3

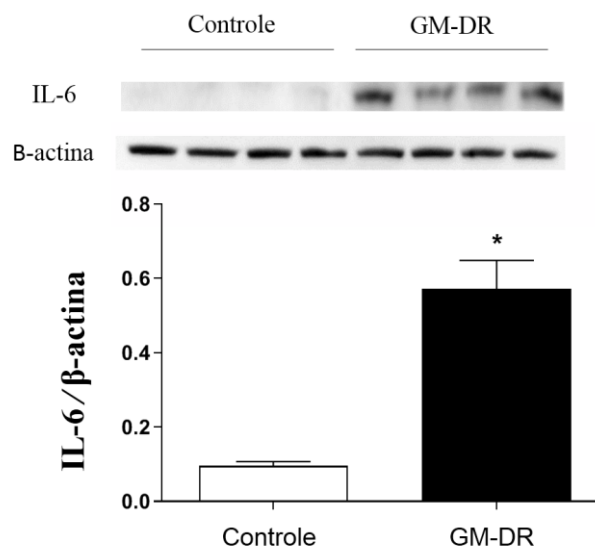


Figura 13: Células BxPC-3 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de IL-6 em 23 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 μ g/ml GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. *p <0,05 GM-DR versus grupo controle.

Figura 14– Expressão de IL-6 em células PANC-1

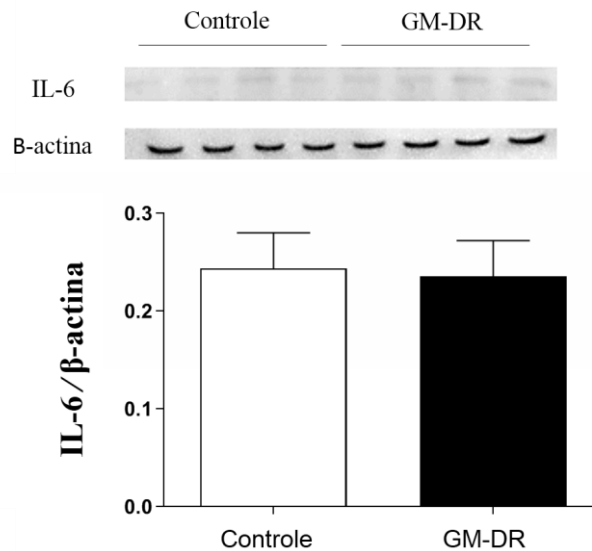


Figura 14: Células PANC-1 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcação de IL-6 em 23 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 $\mu\text{g/ml}$ GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

Visto a modulação da expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 entre os grupos experimentais, também investigamos a expressão do fator nuclear KB, especificamente p65 (NFKB p65) pois a via de sinalização do NFKB p65, é a forma ativada pela via canônica mais abundante, e pode estar relacionada com a resposta transcricional de TNF- α , IL1 e IL6. A linhagem BxPC-3 (Figura 15) (controle $0,63 \pm 0,03$ vs GM-DR $0,56 \pm 0,05$), expressa quantidades semelhantes de NFKB p65 entre os grupos, independente do tratamento com GM-DR. Enquanto células PANC-1 aumentaram a expressão de NFKB p65 após o tratamento (controle $1,46 \pm 0,024$ vs GM-DR $1,82 \pm 0,054$) como mostra a (Figura 16).

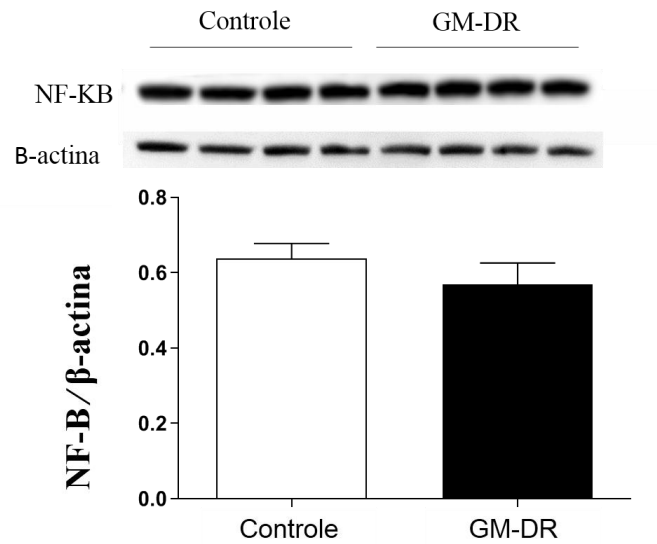
Figura 15– Expressão de NF-κB p65 em células BxPC-3

Figura 15: Células BxPC-3 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de NFKB p65 em 65-70 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 $\mu\text{g/ml}$ GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

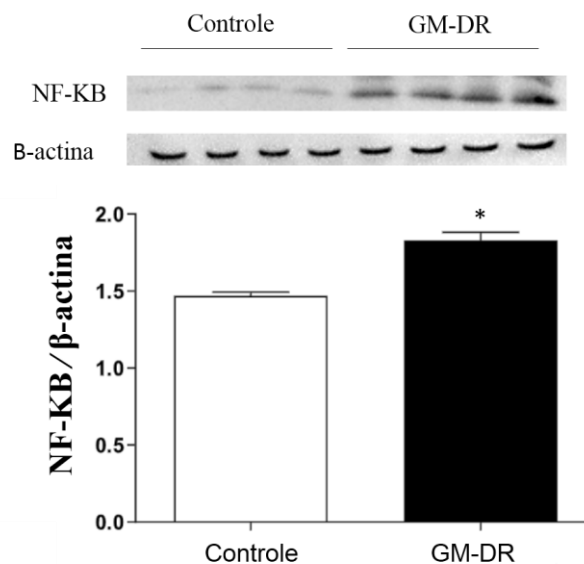
Figura 16– Expressão de NF-κB p65 em células PANC-1

Figura 16: Células PANC-1 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de NFKB p65 em 65-70 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 $\mu\text{g/ml}$ GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

Visto que na linhagem BxPC-3 a GM-DR mostrou regular positivamente citocinas pró-inflamatórias, também quantificamos a expressão de COX-2, envolvida em respostas inflamatórias e que tem sido relacionada com o prognóstico de PDAC e comportamento dos tumores. Curiosamente, células BxPC-3 quando tratadas com GM-DR regulam negativamente a expressão de COX-2 em relação aos níveis basais das células do grupo controle (controle $0,36 \pm 0,14$ vs GM-DR $0,20 \pm 0,02$), como mostra a Figura 17.

Figura 17– Expressão de COX-2 em células BxPC-3

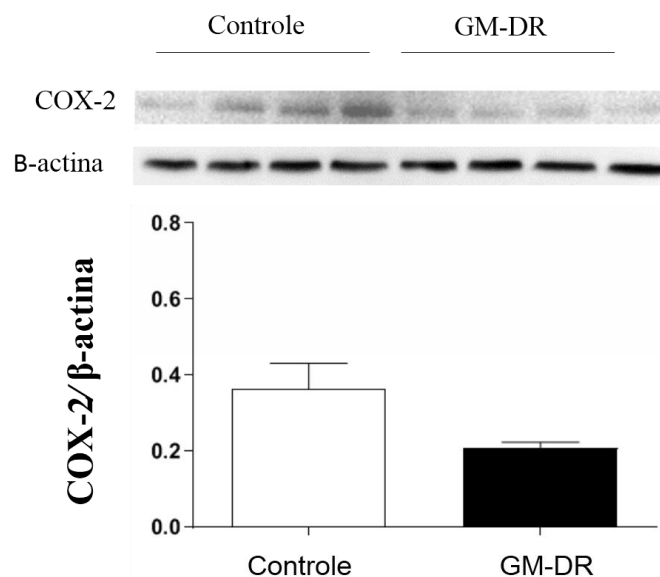


Figura 17: Células BxPC-3 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de COX-2 em 75 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 $\mu\text{g/ml}$ GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

5.2 Marcadores indiretos de estresse oxidativo em células de PDAC tratadas com GM-DR

Embasados nos resultados anteriores, onde foi visto que GM-DR modula positivamente a expressão de citocinas na linhagem BxPC-3, realizamos ensaios para avaliar dois marcadores indiretos de estresse oxidativo de vias de sinalização diferentes, apenas em células BxPC-3.

Com os grupos experimentais idênticos aos anteriores, células do grupo “controle” receberam apenas o meio de cultura padrão, enquanto o grupo “GM-DR” foi tratado com o meio de cultivo contendo 700 µg/ml de GM-DR, por 24h. Quando foram avaliadas a forma induzível de óxido nítrico sintase (iNOS) e a glutatona reduzida (GSH), observou-se que GM-DR não altera o padrão de expressão de iNOS (controle $0,18 \pm 0,004$ vs GM-DR $0,19 \pm 0,010$) Figura 18; já na investigação de glutatona reduzida, houve consumo de GSH no grupo tratado com GM-DR ($140,0 \pm 1,54$) em relação ao grupo controle ($149,0 \pm 1,66$), conforme observado no gráfico 1.

Figura 18– Expressão de iNOS em células BxPC-3

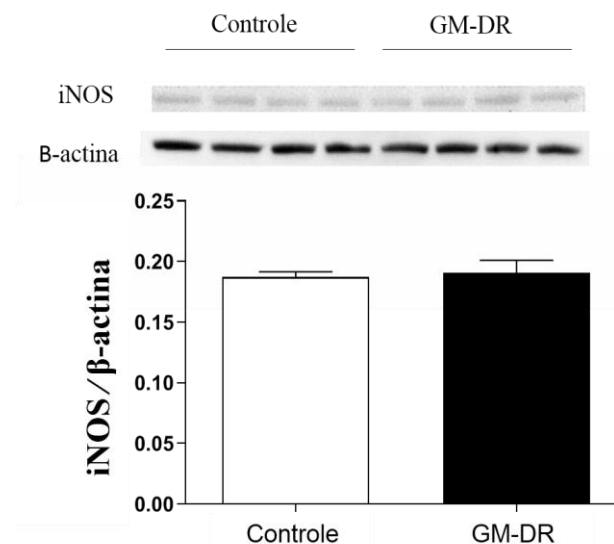


Figura 18: Células BxPC-3 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcagem de iNOS em 130 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 µg/ml GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

Gráfico 1 – Consumo de glutatona reduzida (GSH) em células BxPC-3

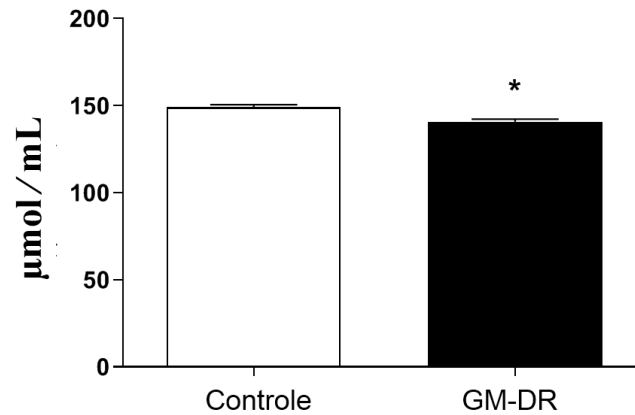


Gráfico 1: Linhagem BxPC-3 (1×10^3 células/poço). Células do grupo “controle” foram incubadas por 24h apenas meio de cultivo enquanto o grupo “GM-DR” recebeu meio de cultivo contendo 700 $\mu\text{g/ml}$ de GM-DR. Resultados expressos com média \pm SEM de 8 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

5.3 Expressão de TLR4 em Células BxPC-3 e PANC-1 tratadas com GM-DR

A expressão de TLR4 em células BxPC-3, vista na Figura 18A, evidencia que as células após serem tratadas com GM-DR (700 $\mu\text{g/ml}$) aumentaram a fluorescência (vermelho) que marcava o receptor alvo da investigação. Foram feitos registros de três campos de visualização diferentes para a análise quantitativa da intensidade de fluorescência de TLR4 em relação ao marcador de núcleo celulares DAPI. Pode-se observar na Figura 18B que, quantitativamente, células BxPC-3 tratadas com GM-DR ($3,68 \pm 0,38$) emitiram maior intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle ($1,25 \pm 0,14$).

Figura 19– Imunofluorescência de TLR4 em células BxPC-3

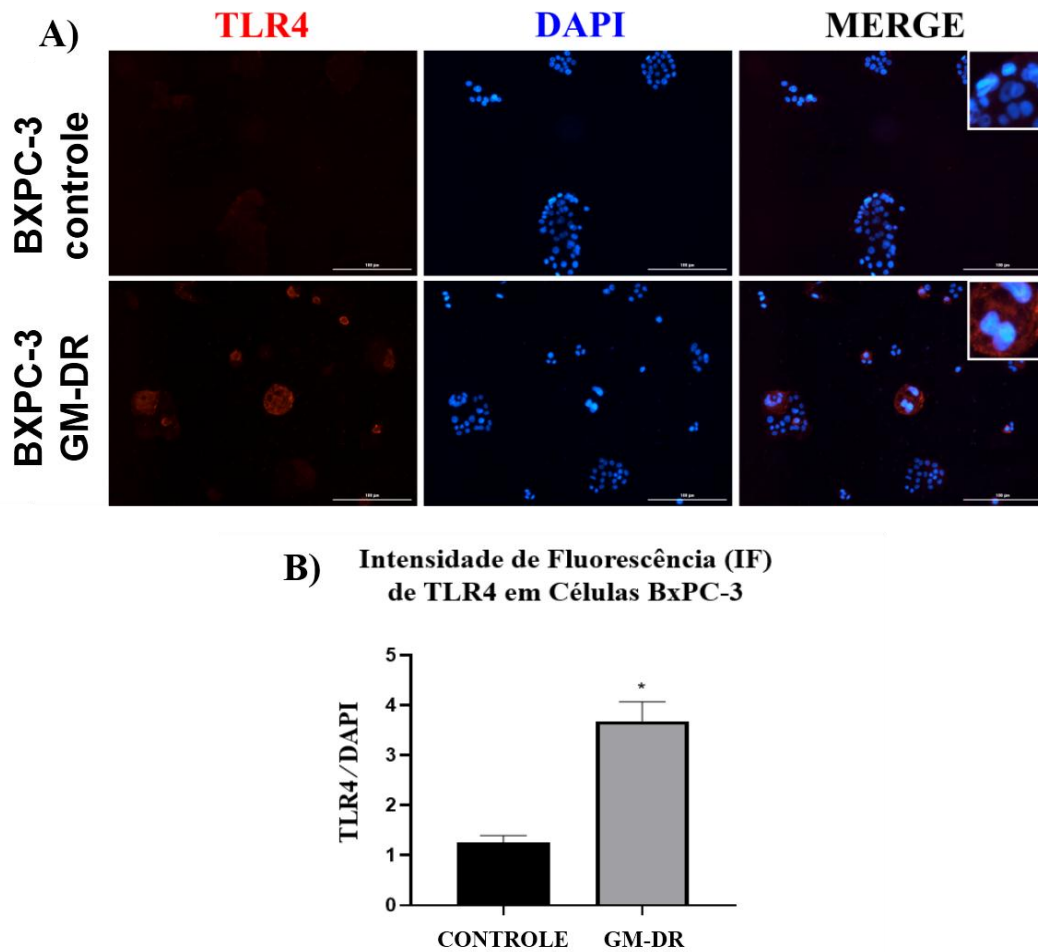
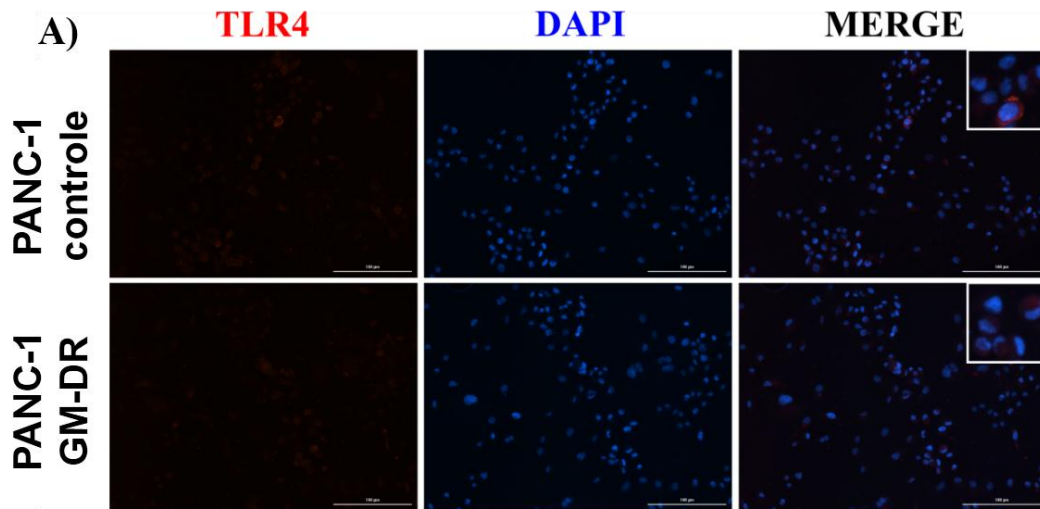


Figura 19: Imunofluorescência na linhagem BxPC-3; no grupo GM-DR as células foram tratadas com GM-DR (700 µg/ml) por 24h enquanto o grupo controle recebeu apenas meio de cultivo. Após o tratamento, as células foram coradas com DAPI (azul) e anticorpo para TLR4 conjugado com Alexa Fluor (vermelho). (A) imagens captadas com leitor multimodal Cytation3™ Biotek®: vermelho (TLR4) azul (núcleo) merge (sobreposição de ambas as marcações). Aumento 200x. (B) quantificação da média de intensidade de fluorescência de TLR4 (Alexa Fluor – vermelho) em relação a quantidade de núcleos (DAPI – azul), resultados apresentados pela média relativa ± SEM de 3 campos por grupo. *p < 0,05 GM-DR versus grupo controle.

Do mesmo modo, também investigamos a expressão de TLR4 na linhagem PANC-1, como uma espécie de controle negativo, enquanto uma linhagem celular de PDAC que não produz resposta citotóxica e pró-inflamatória quando submetida ao tratamento com GM-DR. Diferente de BxPC-3, conforme observa-se nos registros vistos na Figura 19A, células PANC-1 não emitiram imunofluorescência de TLR4 significativamente diferente entre os grupos após incubação com a galactomanana (grupo controle $1,25 \pm 0,07$ vs GM-DR $1,52 \pm 0,15$) Figura 20A.

Figura 20– Imunofluorescência de TLR4 em células PANC-1



B) Intensidade de Fluorescência (IF) de TLR4 em Células PANC-1

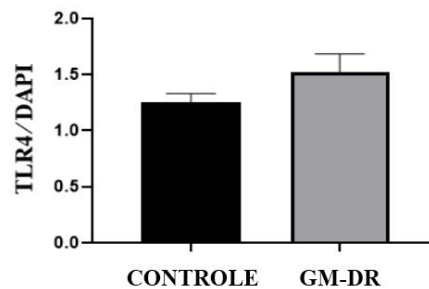


Figura 20: Imunofluorescência na linhagem PANC-1; no grupo GM-DR as células foram tratadas com GM-DR(700 µg/ml) por 24h enquanto o grupo controle recebeu apenas meio de cultivo. Após o tratamento, as células foram coradas com DAPI (azul) e anticorpo para TLR4 conjugado com Alexa Fluor (vermelho). (A) imagens captadas com leitor multimodal Cytation3™ Biotek®: vermelho (TLR4) azul (núcleo) merge (sobreposição de ambas as marcações). Aumento 200x. (B) quantificação da média de intensidade de fluorescência de TLR4 (Alexa Fluor – vermelho) em relação a quantidade de núcleos (DAPI – azul), resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 3 campos por grupo. *p <0,05 GM-DR versus grupo controle.

Para reforçar os achados do ensaio com marcação de imunofluorescência, avaliamos a expressão do TLR4 com a técnica de Western Blot (WB), mantendo os mesmos grupos experimentais e com ambas as linhagens; onde também se evidenciou o aumento da expressão de TLR4 em BxPC-3 ($3,16 \pm 0,10$) em relação ao grupo controle ($1,45 \pm 0,24$) conforme mostra a Figura 21. Diferente da linhagem de células PANC-1 (Figura 21) onde a expressão

de TLR4 no grupo controle ($3,23 \pm 0,43$) foi estatisticamente semelhante ao grupo tratado com GM-DR ($3,49 \pm 0,08$), corroborando com os achados anteriores.

Figura 21– Expressão de TLR4 em células BxPC-3

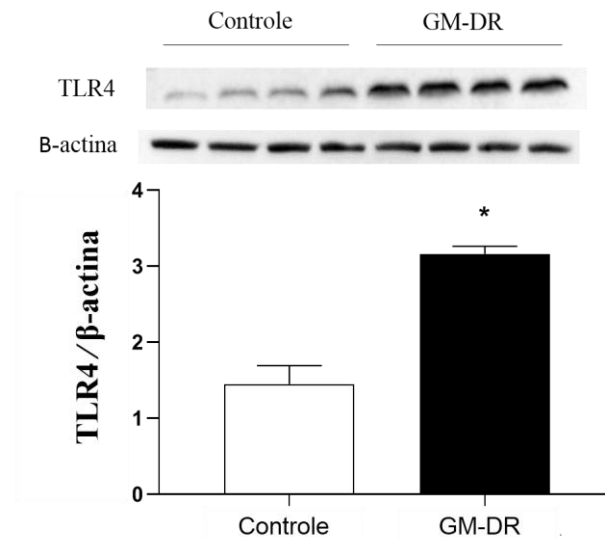


Figura 21: Células BxPC-3 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de TLR4 em 95 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 $\mu\text{g/ml}$ GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

Figura 22– Expressão de TLR4 em células PANC-1

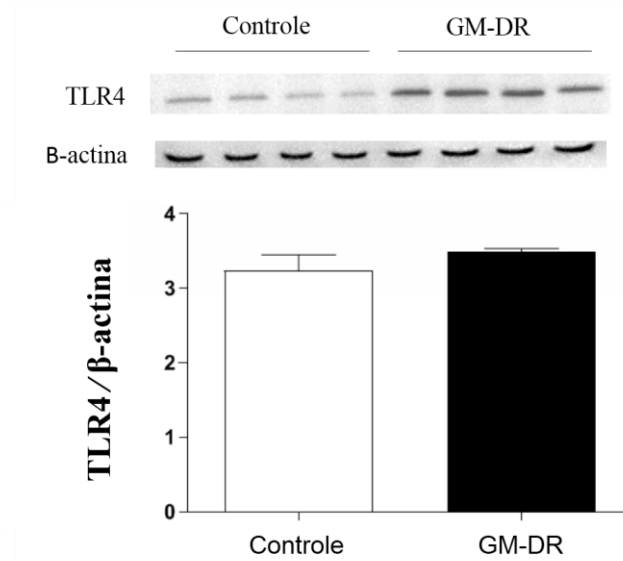
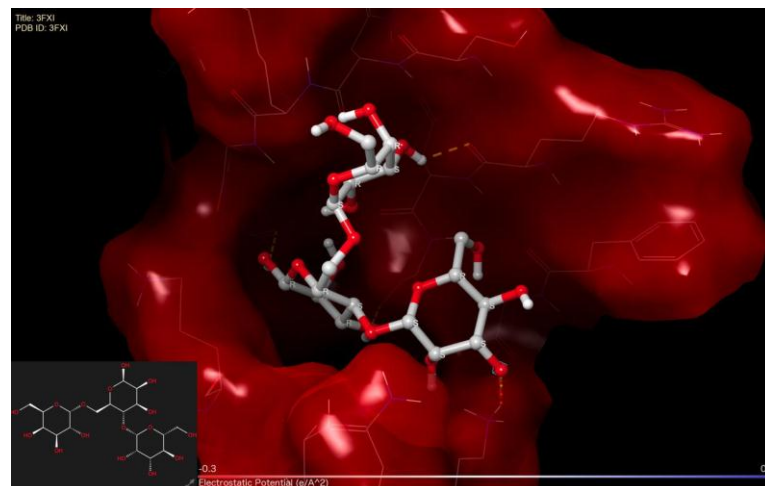


Figura 22: Células PANC-1 ($0,5 \times 10^6$ células/poço). (A) imagem representativa de WB, mostrando imunomarcção de TLR4 em 95 kDa, poços de 1 a 4 representam o controle e de 5 a 8 células tratadas com 700 $\mu\text{g/ml}$ GM-DR 24h. (B) resultados apresentados pela média relativa \pm SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ GM-DR versus grupo controle.

5.4 Análise do acoplamento molecular: GM-DR e receptor TLR4

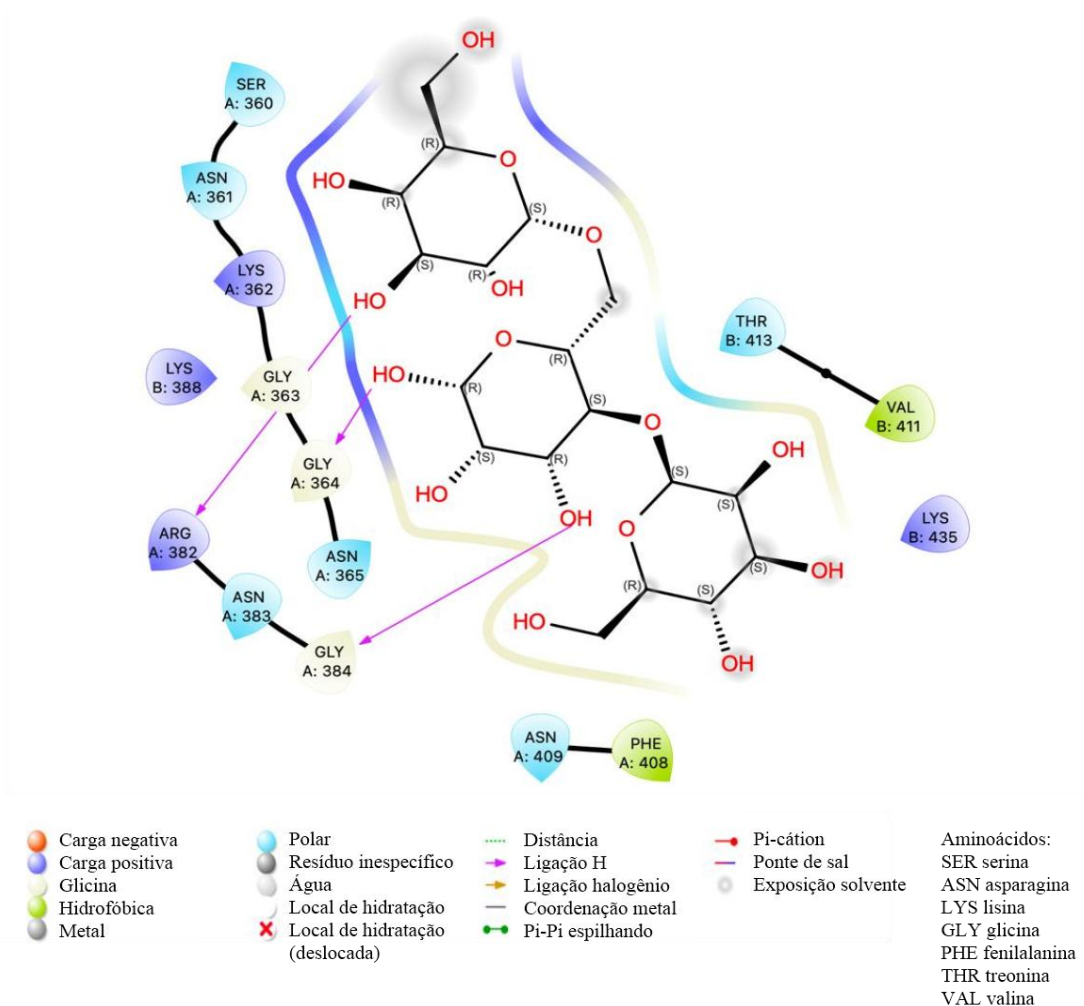
O complexo proteína-ligante foi colocado de forma estável na mesma cavidade TLR4 pelo AutoDock 4.2 (Figura 23).

Figura 23 - Acoplamento de GM-DR ao TLR4 na mesma cavidade do Lipopolissacarídeo (LPS)



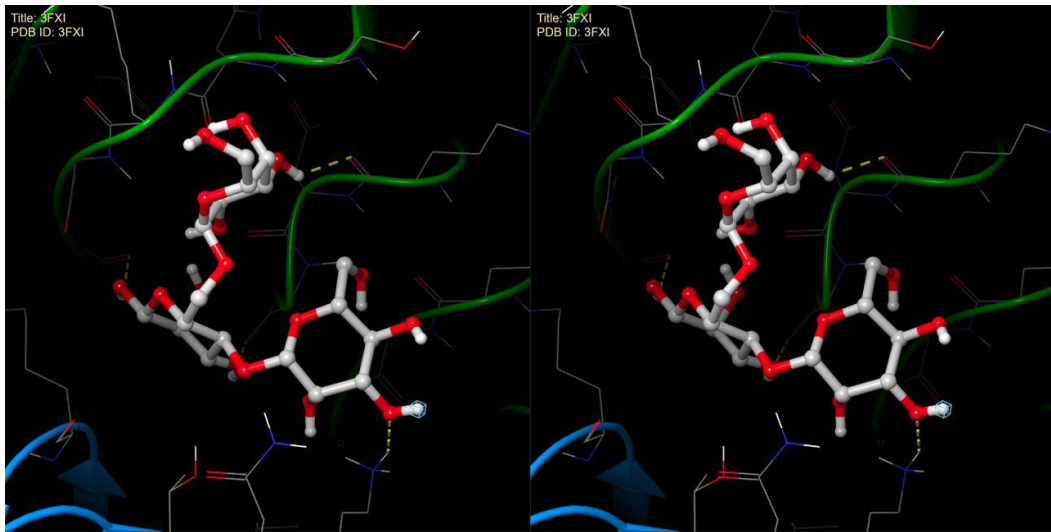
As interações do ligante correspondente à GM-DR ao receptor TLR4 ocorreram com 5 aminoácidos no sítio ativo: ARG264, ASP294, SER 317, THR319 e LYS362, sem a interação de ligações de hidrogênio. O resíduo TYR292, LEU293, TYR296 e VAL318 interagiu com a GM-DR através de forças de Van der Waals. ARG382, GLY364 e GLY384 formaram ligações H com hidroxilas distintas de GM-DR. SER360, ASN 361, ASN 365, ASN 383, THR413 e ASN409 apresentam interação polar com hidroxilas, enquanto LYS 362, LYS 388 (da cadeia B), ARG382 e LYS 435 (da cadeia B) mostram interação iônica. Os tipos de interações com os aminoácidos estão ilustradas na Figura 24.

Figura 24–Tipos de interações GM-DR - TLR4 em visualização 2D



Além disso, energias de ligação da galactomanana de -6,6 kcal/mol em diferentes sete conformações, com constantes de inibição de 14,3 μM . Os resultados da simulação de docking molecular indicam que GM-DR tem grande afinidade de acoplamento ao sítio ativo do TLR4 (Figura 25).

Figura 25–Visão estéreo da ligação GM-DR



6 DISCUSSÃO

Há muitas evidências na literatura sobre o potencial terapêutico de polissacarídeos de origem natural (extraídos de sementes, algas marinhas, fungos) em pesquisas que descrevem, além da ação antitumoral, propriedades imunomoduladoras e antioxidante. Neste trabalho, investigamos o efeito que GM-DR promove sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios e o status oxidativo em duas linhagens de células tumorais pancreáticas humanas *in vitro* (Yu *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2020).

Células BxPC-3 após o tratamento com GM-DR expressaram 9 vezes mais Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) em relação ao grupo controle, enquanto a linhagem PANC-1 não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais. Pesquisas cujo o modelo envolve linhagens de células humanas de PDAC, comumente observam diferentes respostas de acordo com as particularidades de cada linhagem. Pois, conforme descrito por Collisson e col. (2019), a heterogeneidade das células de PDAC, a variabilidade genética e fenotípica dos tumores, implica em diferentes resultados clínicos e respostas biológicas frente ao tratamento farmacológico (Tansi *et al.*, 2024; Collisson *et al.*, 2019).

Assim como nesta pesquisa, outros autores mostraram que fenótipos celulares diferentes respondem de maneira particular à ativos citotóxicos. Arumugam e col. (2009) quando investigaram o padrão de quimiosensibilidade de células PDAC à três agentes antineoplásicos: Gencitabina, 5-FU e cisplatina, mostraram que enquanto BxPC-3 apresentou a sensibilidade aos fármacos Gencitabina, 5-FU e cisplatina, Panc-1 e MiaPaCa-2 foram resistentes aos três quimioterápicos (Arumugam *et al.*, 2009).

Sabendo que existe uma relação entre o TNF- α e ativação da via extrínseca da apoptose, os nossos achados sobre a expressão de TNF- α corroboram como os dados de Marques (2021) onde GM-DR diminuiu a viabilidade de células PDAC apenas na linhagem BxPC-3, mas não em PANC-1 e MiaPaCa-2. E este efeito citotóxico sobre BxPC-3 mostrou ser dependente da ativação de RIPK1 e ativação de caspases 3 e 8, sugerindo que a morte celular induzida por GM-DR parece ser por via apoptótica. Agora, hipotetizamos que esse efeito possa estar associado ao aumento de TNF- α visto nessa linhagem de PDAC.

O TNF- α induz apoptose pela ativação dos receptores TNFR-1. Após sua ativação, o domínio de morte associado ao TNFR (TRADD) recruta três proteínas adaptadoras: RIPK1,

TRAF-2 e FADD (domínio de morte associado ao FAS); essa cascata leva à ativação da pró-caspase 8 com desfecho de morte celular apoptótica (Zidi *et al.*, 2010).

O aumento de TNF- α na terapia oncológica, pode aumentar o estresse oxidativo e sensibilizar os tumores à apoptose. E como as células endoteliais dos vasos sanguíneos dos tumores têm maior expressão do receptor TNFR-1 em comparação à células saudáveis, a ação do TNF- α poderia se dar de forma mais direcionada à região tumoral (Van Horsen; Ten Hagen; Eggermont, 2006).

Além de ser capaz de induzir a morte celular, em estudos *in vivo*, TNF- α melhorou a resposta dos tumores à drogas quimioterápicas como melfalano e doxorrubicina. Contribuindo para esse feito a sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular, facilitando a captação e acúmulo de quimioterápicos nos tumores (Anderson; Nakada; Dewitte, 2004).

Fajardo e col. (1992), relataram que altas concentrações de TNF- α tem ação antiangiogênica, enquanto baixas concentrações promovem angiogênese. Também está relacionado com essa molécula, a produção de outros mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β e IL-6 (Fajardo *et al.*, 1992; Zidi *et al.*, 2010).

Na literatura, há muitas evidências sobre a correlação entre as diferentes citocinas. O TNF- α , por exemplo, pode induzir a produção de pró-IL-1 β (Marucha; Zeff; Kreutzer, 1990); e a pró-IL-1 β pode aumentar a transcrição de outros genes pró-inflamatórios (Zhang *et al.*, 2023).

Quando investigamos a expressão de interleucinas nas duas linhagens de células PDAC, foi constatado que apenas células BxPC-3 responderam ao tratamento com GM-DR com aumento significativo de IL-1 β e IL-6. Diferente dos nossos resultados com GM-DR em células cancerígenas, em modelo animal de ferida cutânea a galactomanana de *Delonix regia* teve efeito anti-inflamatório, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 (Lima *et al.*, 2022).

Assim como GM-DR aumentou a produção de IL-1, sabe-se que alguns fármacos quimioterápicos podem ativar os chamados “inflamassomas” em células cancerígenas e células mieloides, e esses inflamassomas levam a ativação de cascatas inflamatórias, com a maturação de IL-1 β , ativação da protease caspase 1 e morte celular (piroptose ou apoptose) (Zhang *et al.*, 2023).

A produção de citocinas pró-inflamatórias (ex.: TNF- α , IL1 β , IL6) no ambiente tumoral, tem um grande impacto na terapia do câncer com efeitos relacionados à imunogenicidade contra os tumores, apoptose, proliferação celular e ação antiangiogênica (Ullman *et al.*, 2022; Balkwill, 2002; Fajardo *et al.*, 1992; Zidi *et al.*, 2010).

De fato, a ação de mediadores pró-inflamatórios no ambiente tumoral pode ter repercussões imunogênicas. Alguns agentes quimioterápicos, como o Paclitaxel, podem aumentar a imunogenicidade dos tumores com a participação desses mediadores. O aumento de citocinas do tipo Th1, como TNF- α , IL-12 e Interferon gama (IFN γ) levam à polarização de macrófagos M2 para o fenótipo M1, considerado um fenótipo tumoricida. Os efeitos "colaterais" imunomoduladores da quimioterapia têm efeitos benéficos, seja por modular a composição e funcionalidade do infiltrado de células imunológicas, ou por aumentar efetores imunes no microambiente tumoral, produzindo uma resposta anticancerígena completa (Wanderley *et al.*, 2018; Galluzzi *et al.*, 2015).

Tem sido cada vez mais discutida a contribuição de respostas imunogênicas para eficácia de agentes antineoplásicos no tratamento do câncer. Em especial, em tumores como PDAC, considerados imunologicamente “frios”, alguns trabalhos experimentais tentaram torná-los imunologicamente ativos, para iniciar respostas inflamatórias no microambiente tumoral (TME) atraindo assim células imunes, como células T citotóxicas (Ullman *et al.*, 2022).

Por isso, como foi proposto no presente trabalho, investigações sobre a modulação de mediadores pró-inflamatórios em pesquisas pré-clínicas são fundamentais no desenvolvimento de novas estratégias e moléculas com ação antitumoral, para prever efeitos imunológicos colaterais, expandindo a compreensão sobre a ação anticancerígena para além da citotoxicidade.

Após a constatação desse aumento na produção de TNF- α , IL1 β e IL6 em células BxPC-3 tratadas com GM-DR, resolvemos avaliar a expressão do fator nuclear Kappa B (NF κ B), importante regulador transcricional em respostas imunes e inflamatórias. Chien e col. (2014) relataram que existe uma relação entre a atividade repórter de NF κ B antiproliferativa estimulada por TNF- α em células de câncer de pâncreas (Chien *et al.*, 2014).

Pudemos avaliar apenas o dímero NF κ B p65, que regula a transativação de genes envolvidos na proliferação celular, produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), também regula genes de enzimas (COX-2, iNOS), quimiocinas e mediadores de apoptose.

A expressão de NF κ B p65 nas células PDAC também diferiu entre as linhagens. Observamos que a linhagem BxPC-3 expressa níveis basais mais elevados do que células PANC-1, e quando estimuladas com GM-DR não aumentaram a expressão do dímero p65. Diferentemente, PANC-1 aumentou a produção de NF κ B p65 após o tratamento com GM-DR. A regulação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 embora pudesse estar relacionada concomitantemente ao aumento da expressão de p65, não se restringe à esta condição. É importante ressaltar que pela limitação do presente trabalho, as outras subunidades da família NF κ B não foram quantificadas. Ademais, a expressão do fator nuclear Kappa B per se não significa que o mesmo esteja na sua forma ativa. A quantificação considerada no nosso trabalho expressa o total de NF κ B p65, sem discriminar a porção nuclear e do citosol. O NF κ B no citosol normalmente se encontra na forma inativa, por estar complexado à proteínas inibitórias, como membros da família I κ B (Liu *et al.*, 2017).

O trabalho de Liu e col. (2017) descreveu a ativação de NF κ B, por duas vias: canônica ou não canônica. A via canônica se inicia pela ação de ligantes de receptores de citocinas, receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), membros da superfamília do receptor de TNF (TNFR) e outros; com isso as respostas intracelulares levam a degradação do complexo I κ B-NF κ B, levando à translocação nuclear rápida e transitória predominantemente dos dímeros p50/RelA e p50/c-Rel. Já a via não-canônica responde à ligantes da superfamília TNFR, como BAFFR, CD40 e RANK. Essa via já não envolve a degradação do complexo I κ B-NF κ B, depende de precursores como p100 e resulta na translocação nuclear de p52/RelB. Sendo a via canônica envolvida em quase todas as respostas imunes, enquanto a via não canônica parece ser um eixo de sinalização suplementar da via canônica. Diante disso, fica claro que a ativação de NF κ B pode ocorrer por mecanismos distintos, levando à translocação de dímeros diferentes para atuar no núcleo celular (Liu *et al.*, 2017).

Enquanto os efeitos benéficos de muitos compostos naturais, como a curcumina em doenças inflamatórias crônicas, foram atribuídos à redução da sinalização do NF κ B p65, um estudo observacional exploratório que investigou a relação da expressão NF κ B com a sobrevida de pacientes com PDAC, relatou que tumores que expressaram mais NF κ B, no citoplasma ou no núcleo celular, tiveram um melhor prognóstico da doença; sugerindo que no contexto das neoplasias malignas do pâncreas, o papel da inflamação é mais complexo (Liu *et al.*, 2017; Renaldi *et al.*, 2023).

Nos ensaios iniciais, utilizando as duas linhagens de células PDAC: BxPC-3 e PANC-1, avaliamos as respostas celulares após o tratamento de 24h com GM-DR traçando uma

comparação entre as duas linhagens de PDAC. Observando a regulação positiva de TNF- α , IL-1 β , IL-6 apenas em células BxPC-3, além de níveis basais relativamente mais altos de NFKB p65 nessa linhagem em relação à células PANC-1, seguimos a investigação da expressão de COX-2 e do status redox apenas na linhagem BxPC-3, antes e depois da exposição à GM-DR.

Diferente dos outros mediadores pró-inflamatórios, GM-DR diminuiu a expressão de COX-2 em células BxPC-3. A presença de COX-2 em tumores pancreáticos, é significativamente maior do que no pâncreas saudável. Yip-Schneider e colaboradores (2000) relataram que a linhagem BxPC-3 tem os níveis basais mais elevados da enzima dentre 8 linhagens testadas; e que o aumento de COX-2 pode inibir a apoptose, aumentar o potencial metastático e angiogênese (Yip-Schneider *et al.*, 2000; Fridman, *et al.*, 2012).

Enquanto segundo Fridman e colaboradores (2012) em diversas coortes com pacientes oncológicos, níveis elevados de moléculas imunossupressoras, como a prostaglandina-endoperoxido sintase 2, mais conhecida como COX-2, foram correlacionados com pior prognóstico da doença; no estudo observacional de Renaldi e colaboradores (2023), que avaliou a associação de COX-2 com a sobrevivência de pacientes com PDAC, COX-2 não mostrou ter associação significativa com prognóstico da doença. Portanto, o significado prognóstico da expressão de COX-2 no contexto do PDAC ainda é conflitante (Fridman *et al.*, 2012; Renaldi *et al.*, 2023).

O status redox de células BxPC-3 tratadas com GM-DR foi avaliado por indicadores indiretos de estresse oxidativo. O aumento da expressão de TNF- α após o tratamento com GM-DR visto na linhagem BxPC-3, poderia sensibilizar essas células ao estresse oxidativo (Van horssen; Ten Hagen; Eggermont, 2006).

Quando avaliamos o nível de GSH em células BxPC-3, vimos que houve maior consumo de GSH após o tratamento com GM-DR, com isso, podemos inferir que houve maior atividade da enzima glutathione peroxidase em resposta ao aumento de espécies reativas de oxigênio. Lindholm, Ejeskär e Szekeres (2022) relataram diferenças nas taxas basais de produção de EROS entre as linhagens celulares BxPC-3, CFPAC-1, Panc-1 e AsPC-1; e quando testaram o efeito do glicosídeo Digitoxina, a concentração de EROS aumentou significativamente em todas as quatro linhagens celulares, com efeitos semelhantes entre as linhagens BxPC-3 e PANC-1 (Lindholm; Ejeskär; Szekeres, 2022).

Segundo Ozben (2007), o estresse oxidativo é inerente à terapia contra o câncer e altos níveis de estresse oxidativo são tóxicos, enquanto níveis baixos podem estar associados à proliferação celular, de modo que a resposta adaptativa ou de morte celular depende do status redox (Ozben, 2007).

Também foi quantificada a expressão da enzima iNOS, a isoforma que mais gera ON e é expressa em altos níveis em diversos tumores. Nesse aspecto, a expressão de iNOS em células BxPC-3 mostrou-se semelhante, independente do tratamento com GM-DR. No câncer, o ON desempenha um duplo papel, dependendo dos níveis desse agente oxidante, podendo reagir com radicais de oxigênio e formar peroxinitrito que culmina na nitrosilação de proteínas sinalizadoras. Essa sinalização nitrosativa em células tumorais pode favorecer a proliferação, metástase e resistência ao tratamento (Glynn *et al.*, 2010).

Os resultados aqui documentados, evidenciaram que GM-DR induz o aumento de TNF- α , IL-1 β , IL-6 em células BxPC-3, configurando uma resposta intracelular pró-inflamatória e também parece aumentar o estresse oxidativo relacionado ao consumo de GSH.

Segundo a literatura, os monossacarídeos Glicose, Galactose, Manose e Arabinose são os mais frequentemente associados à respostas imunes; destes, dois fazem parte da composição da galactomanana. Alguns polissacarídeos como arabinogalactana, galactomanana e polissacarídeos pécticos (derivados de plantas), β -glucanos e glicoproteínas (derivadas de cogumelos), polissacarídeos sulfatados (derivados de algas marinhas) realmente possuem atividade imunomoduladora, mas, diferente dos nossos achados, em outros modelos demonstram efeito antioxidante (Yu *et al.*, 2018).

Buscamos investigar de que modo GM-DR poderia interagir com as células PDAC. Polissacarídeos podem se ligar à receptores de membrana e assim modular respostas celulares. Acredita-se que muitos polissacarídeos podem ser reconhecidos por receptores tipo-toll (TLRs) em macrófagos, células dendríticas e monócitos, por exemplo, para em seguida ativarem a liberação de agentes pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas, ativando respostas imunológicas (Manero-rupérez *et al.*, 2020; Li, *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2018).

Segundo Li e colaboradores (2022), a ativação imune clássica por polissacarídeos com ação agonista de TLR4, manifesta-se principalmente com o aumento de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como: TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, CCL2, CCL4, CXCL9 e MCP-1. Isso nos levou a investigar o receptor TLR4 como possível alvo de interação com GM-DR (Li, *et al.*, 2022).

Descobrimos que, embora haja expressão constitutiva do receptor TLR4 em ambas as linhagens, o tratamento com GM-DR aumentou a imunofluorescência e expressão do TLR4 na linhagem de células BxPC-3, mas não em células PANC-1. Considerando que a mesma linhagem de células que aumentou a expressão de TLR4, também foi a que regulou positivamente a expressão de TNF- α e interleucinas, investigamos evidências que correlacionassem esses achados.

Alguns mediadores pró-inflamatórios podem regular expressão de mRNA de TLR4, como IFN- γ , IL-1 β e TNF- α em linhagens de células epiteliais intestinais e células endoteliais. Portanto, em teoria, a maior expressão do receptor TLR4 poderia ter relação com o aumento de IL-1 β e TNF- α vistos em células BxPC-3 tratadas com GM-DR (Abreu *et al.*, 2002; Rehli *et al.*, 2000).

O estudo de Hu e colaboradores (2021) avaliou a expressão de TLR4 entre células cancerígenas e tecidos saudáveis. O valor prognóstico da expressão de TLR4 depende da localização dos tumores e que a expressão de TLR4 tem relação com a infiltração de células B, células T CD4 e CD8, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas no ambiente tumoral (Hu *et al.*, 2021).

Enquanto alguns autores relatam uma correlação positiva entre TLR2 e TLR4 com melhor prognóstico e regressão do câncer de pâncreas, outros também relatam que a ativação de TLR4 e CAP1 com Resistina, aumentam a capacidade de células cancerígenas de resistirem à terapia (Orlacchio; Mazzone, 2021).

Vários polissacarídeos interagem com receptores TLR4 para produzir respostas inflamatórias. Como exemplo, o polissacarídeo de *Dendrobium huoshanense* que estimula macrófagos a secretar ON, TNF- α e IL-1 β e tem o TLR4 como um receptor central para interação dos macrófagos como polissacarídeo (Xie *et al.*, 2016). E essa inflamação induzida por TLR4 poderia envolver a participação da via do TRAF6 ou Myd88 no início da cascata intracelular (Zhang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2022).

O polissacarídeo de *Acanthopanax giraldii* aumenta liberação de citocinas IL-6 e TNF- α em macrófagos de maneira dependente de TLR4, com ativação da sinalização ERK e JNK/NF κ B a jusante (Li *et al.*, 2019).

As respostas biológicas do polissacaropeptídeo-K extraído de cogumelos *Coriolus versicolor* também parecem ser dependentes da ativação de TLR2 e TLR4. PSK é imunomodulador e antitumoral. Inibe a proliferação celular, induz aumento de TNF- α , IL-6 e induz a apoptose em células de adenocarcinoma pancreático *in vitro* (Rosendahl *et al.*, 2012). A ativação imune mediada por polissacarídeos via TLR4 poderia contribuir para favorecer a apoptose de células cancerígenas (Zhang, *et al.*, 2017).

Curiosamente, polissacarídeos via TLR4 ao mesmo tempo que aumentam a inflamação, podem atenuar a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e PGE2), quimiocinas (MCP-1, RANTES e MIP-1), moléculas tóxicas (NO e ROS) e inibir a atividade de enzimas como COX-2 e iNOS (Li, *et al.*, 2022).

É interessante que células-tronco mesenquimais, após ativação de TLR4, apresentam um fenótipo pró-inflamatório e inibem a proliferação de células PANC-1, além de induzirem apoptose (Kaçaroglu; Yaylaci; Gurbuz, 2024).

De modo geral, agonistas de TLRs são considerados imunomoduladores potentes de respostas inatas e adaptativas; e têm sido explorados no tratamento contra o câncer. Há evidências de que a ativação de TLRs poderia aumentar a sensibilidade das células cancerígenas à quimioterapia, radiação e imunoterapia, além de melhorar a imunogenicidade das vacinas de células dendríticas *ex vivo* (Iribarren *et al.*, 2016).

A variabilidade e complexidade das moléculas de polissacarídeos dificulta a compreensão exata da interação com receptores. Atualmente a teoria mais aceita de como polissacarídeos modulam o sistema imunológico envolve o reconhecimento por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). O PRR mais estudado nesse contexto tem sido o TLR4, mas, vale ressaltar que pode haver inespecificidade de interação, e o mesmo polissacarídeo pode interagir simultaneamente com outros receptores de reconhecimento de padrões de superfície (Li, *et al.*, 2022).

Utilizamos recursos de docking molecular para identificar quais são os resíduos chave e as forças intermoleculares que suportariam a ideia do reconhecimento de GM-DR por TLR4 pela afinidade de formação do complexo receptor-ligante. Descobrimos que GM-DR tem uma forte afinidade de ligação no sítio ativo do receptor TLR4, podendo ligar-se firmemente na mesma cavidade do LPS. Esses dados nos forneceram evidências de que o receptor TLR4 pode ter um papel central nas respostas intracelulares induzidas por GM-DR em células de PDAC.

Embora os mecanismos de interação ainda não tenham sido completamente elucidados, sabe-se que polissacarídeos com diferentes estruturas são reconhecidos pelo receptor TLR4. O trabalho de Li e colaboradores (2022) reuniu muitos pontos relevantes sobre a interação de polissacarídeos com esse receptor.

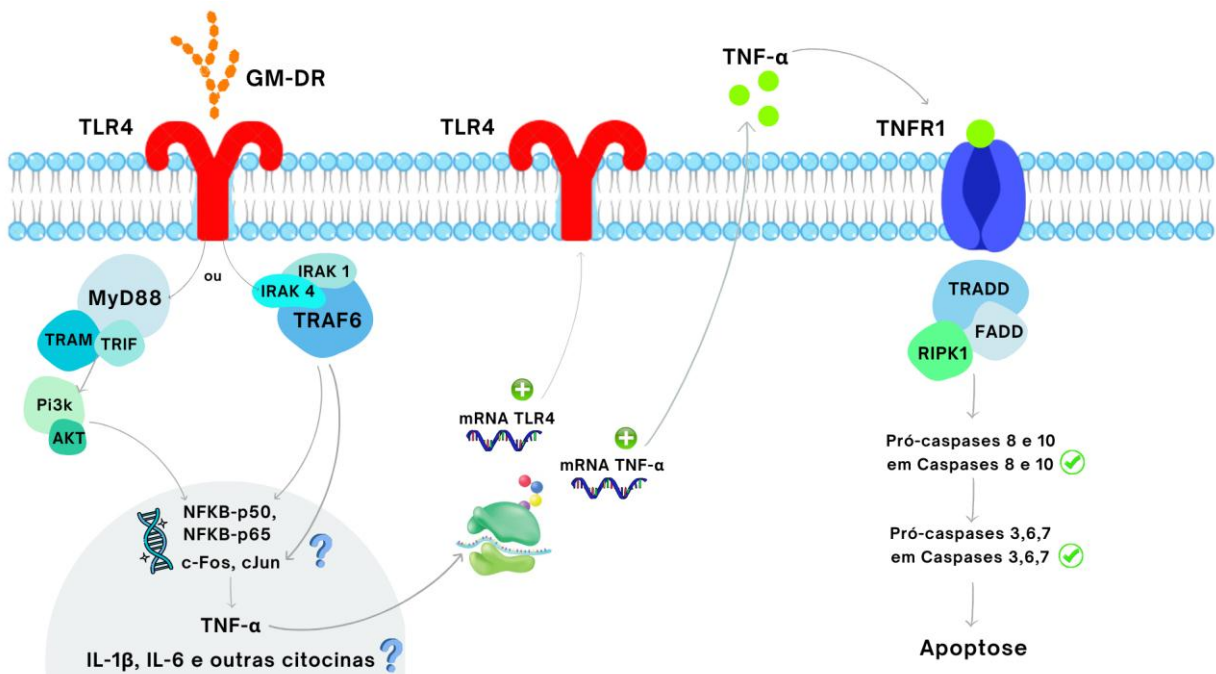
A Mw de polissacarídeos relacionados ao TLR4 varia de 2,53 kDa a 2.490 kDa; mais precisamente na faixa de 10 a 100 kDa têm maior probabilidade de interagir com o TLR4. Monossacarídeos de seis carbonos parecem ter mais vantagens de interação com o TLR4. Ademais, a combinação e proporção de monossacarídeos do polissacarídeo é muito variável. De acordo com a literatura, polissacarídeos de cadeia ramificada parecem ter maior afinidade com o TLR4. Em relação aos grupos funcionais, principalmente o grupo sulfato e o grupo acetil de ocorrência natural são importantes para a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos (Li, *et al.*, 2022).

A interação de ligantes com o TLR4 pode ser dependente de moléculas acessórias como a proteína diferencial mieloide-2 (MD2). A MD2 contém domínios funcionais distintos e pode ligar-se separadamente ou simultaneamente aos TLRs (TLR4 ou TLR2) e seus ligantes. Essa interação de MD2 com o TLR4 amplifica o reconhecimento dos ligantes, como o lipopolissacarídeo (LPS). Além disso, a MD2 influencia a regulação positiva da expressão de TLR4 e parece repercutir sobre a distribuição intracelular de TLR4 (Xu; Li, 2004).

Em suma, a resposta pró-inflamatória de polissacarídeos com ação agonista de TLR4, manifesta-se principalmente pela produção de TNF- α , EROS, ON, IL-6, IL-1 β , NFkB; e, os resultados aqui descritos, sugerem que a GM-DR ativa a resposta inflamatória clássica de polissacarídeos via TLR4 em células BxPC-3 (Zhang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2022).

Diante dos resultados aqui descritos e embasados na literatura, propomos na Figura 26 um modelo hipotético de interação da GM-DR com a linhagem BxPC-3 de células humanas de adenocarcinoma ductal pancreático.

Figura 26– Modelo hipotético de interação da GM-DR com células BxPC-3



Fonte: elaborada pela autora.

GM-DR pode ligar-se ao receptor TLR4 de células BxPC-3 ativando respostas intracelulares. A ligação receptor-ligante inicia no ambiente intracelular o recrutamento de complexos de proteínas adaptadoras (via MyD88 ou independente de MyD88) resultando na ativação de fatores de transcrição que, no núcleo celular, aumentam a produção de RNA mensageiro para a síntese de mediadores pró-inflamatórias como TNF- α , IL1 β , IL6 e outras proteínas não investigadas no nosso estudo. O aumento de TNF- α pode estar relacionado com o aumento da expressão de TLR4 e do próprio TNF- α . A liberação de TNF- α no meio extracelular, por sinalização autócrina, pode ativar receptores TNFR1. Os receptores TNFR1 ativados também recrutam proteínas adaptadoras e domínios de morte celular que levam à ativação de pró-caspases em caspases ativas, induzindo assim a morte celular apoptótica.

7 CONCLUSÃO

- GM-DR aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1 β e IL6 na linhagem BxPC-3 de células humanas de adenocarcinoma ductal pancreático;
- O efeito de GM-DR sobre o estresse oxidativo foi evidenciado pelo consumo de glutathione reduzida (GSH) na linhagem BxPC-3;
- GM-DR aumenta a expressão de TLR4 em células BxPC-3;
- GM-DR tem afinidade de acoplamento molecular com o TLR4 e que parece ter um efeito agonista do receptor ativando assim uma resposta pró-inflamatória.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Maria T. et al. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 23, p. 20431-20437, 2002.
- ADAMSKA, A. et al. Molecular and cellular mechanisms of chemoresistance in pancreatic cancer. **Adv Biol Regul.**, v. 68, p. 77-87, 2018.
- ANDERSON, G. Mark; NAKADA, Marian T.; DEWITTE, Mark. Tumor necrosis factor- α in the pathogenesis and treatment of cancer. **Current opinion in pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 314-320, 2004.
- ANSARI, Daniel et al. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. **Future oncology**, v. 12, n. 16, p. 1929-1946, 2016.
- ARUMUGAM, T. et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. **Cancer research**, v.69, n.14, p.5820–5828, 2009.
- BADGLEY, Michael A. et al. Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice. **Science**, v. 368, n. 6486, p. 85-89, 2020.
- BAMFORD, Sally et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. **British journal of cancer**, v. 91, n. 2, p. 355-358, 2004.
- BALKWILL, Fran. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine & growth factor reviews**, v. 13, n. 2, p. 135-141, 2002.
- BERNARD, P. H. Physiology of the exocrine pancreas. In: **Radiology of the Pancreas**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 9-19.
- BERTHELOOT, Damien; LATZ, Eicke; FRANKLIN, Bernardo S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 5, p. 1106-1121, 2021.
- BUKOWSKI, Karol; KCIUK, Mateusz; KONTEK, Renata. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.
- CHANG, David W. et al. c-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. **The EMBO journal**, v. 21, n. 14, p. 3704-3714, 2002.
- CHEN, Xin et al. Cell death in pancreatic cancer: from pathogenesis to therapy. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 18, n. 11, p. 804-823, 2021.
- CHIEN, Wenwen et al. Growth inhibition of pancreatic cancer cells by histone deacetylase inhibitor belinostat through suppression of multiple pathways including HIF, NF κ B, and mTOR signaling *in vitro* and *in vivo* . **Molecular carcinogenesis**, v. 53, n. 9, p. 722-735, 2014.

CHICOINE, Michael R. et al. The *in vivo* antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by Toll-like receptor 4. **Neurosurgery**, v. 60, n. 2, p. 372-381, 2007.

COLLISSON, Eric A. et al. Molecular subtypes of pancreatic cancer. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 4, p. 207-220, 2019.

DA SILVA NASCIMENTO, F. G. et al. Galactomannan of *Delonix regia* seeds reduces nociception and morphological damage in the rat model of osteoarthritis induced by sodium monoiodoacetate. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, n. 3, p. 491-501, 2021.

DU, Jiali; GU, Jichun; LI, Ji. Mechanisms of drug resistance of pancreatic ductal adenocarcinoma at different levels. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 7, p. BSR20200401, 2020

FAJARDO, Luis F. et al. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. **The American journal of pathology**, v. 140, n. 3, p. 539, 1992.

FERLAY J. et al. **Global cancer observatory: cancer today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: agosto. 2023.

FIORINI, Claudia et al. Mutant p53 stimulates chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 1, p. 89-100, 2015.

FRAKER, Douglas L. et al. Treatment of patients with melanoma of the extremity using hyperthermic isolated limb perfusion with melphalan, tumor necrosis factor, and interferon gamma: results of a tumor necrosis factor dose-escalation study. **Journal of clinical oncology**, v. 14, n. 2, p. 479-489, 1996.

FRIDMAN, Wolf Herman et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298-306, 2012.

GALLUZZI, Lorenzo et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. **Cancer cell**, v. 28, n. 6, p. 690-714, 2015.

GARAY, Ricardo P. et al. Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help. **European journal of pharmacology**, v. 563, n. 1-3, p. 1-17, 2007.

GIRIDHARAN, Sivagami; SRINIVASAN, Mythily. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. **Journal of inflammation research**, p. 407-419, 2018.

GLOBOCAN. Câncer today. Global Câncer Observatory, International Agency for Research on Cancer 2022. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&types=1 Acesso em: janeiro 2024.

GLOBOCAN. Câncer tomorrow. Global Câncer Observatory, International Agency for Research on Cancer 2022. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?multiple_populations=0&mode=cancer&multiple_cancers=1&types=0&cancers=13 Acesso em: janeiro 2024.

- GLYNN, Sharon A. et al. Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor–negative breast cancer patients. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3843-3854, 2010.
- GOECKS, Jeremy et al. Open pipelines for integrated tumor genome profiles reveal differences between pancreatic cancer tumors and cell lines. **Cancer medicine**, v. 4, n. 3, p. 392-403, 2015.
- GRANT, Trevor J.; HUA, Kevin; SINGH, Anurag. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 144, p. 241-275, 2016.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Cell death by apoptosis. **Brazilian Journal of cancerology**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- HART, Phil A.; CONWELL, Darwin L. Secretion of the Human Exocrine Pancreas in Health and Disease (Version 1.0). **Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base**, 2017.
- HAYES, John D.; DINKOVA-KOSTOVA, Albena T.; TEW, Kenneth D. Oxidative stress in cancer. **Cancer cell**, v. 38, n. 2, p. 167-197, 2020.
- HENRY, Brandon Michael et al. Development of the human pancreas and its vasculature—an integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 221, p. 115-124, 2019.
- HU, Jialing et al. Differential expression of the TLR4 gene in pan-cancer and its related mechanism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 700661, 2021.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf> Acesso em: fevereiro. 2024.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Atlas online de mortalidade**. [Rio de Janeiro: INCA, 2020a]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb>. Acesso em: dezembro. 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer. Tipos de câncer. **Câncer de pâncreas**. Rio de Janeiro: INCA, 2022f. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pancreas>. Acesso em: fevereiro. 2023.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 6 edição. Rio de Janeiro:INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/abc-do-cancer-abordagens-basicas-para-o-controle-do-cancer> Acesso em: janeiro.2024
- IRIBARREN, Kristina et al. Trial Watch: Immunostimulation with Toll-like receptor agonists in cancer therapy. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 3, p. e1088631, 2016.
- JIANG, Yan; SOHAL, Davendra PS. Pancreatic adenocarcinoma management. **JCO Oncology Practice**, v. 19, n. 1, p. 19-32, 2023.

- KAÇAROĞLU, Demet; YAYLACI, Seher; GURBUZ, Nilgun. Anti-tumorigenic effects of naive and TLR4-primed adipose-derived mesenchymal stem cells on pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Cancer Medicine**, v. 13, n. 2, p. e6964, 2024.
- KANG, Yeo Wool *et. al.* KRAS targeting antibody synergizes anti-cancer activity of gemcitabine against pancreatic cancer. **Cancer Lett.** P 174-186, 2018.
- KLEIN, Alison P. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 18, n. 7, p. 493-502, 2021.
- KOLBEINSSON, Hordur Mar *et al.* Pancreatic cancer: a review of current treatment and novel therapies. **Journal of Investigative Surgery**, v. 36, n. 1, p. 2129884, 2023.
- KUMAR, Vijay; BARRETT, James E. Toll-like receptors (TLRs) in health and disease: an overview. **Toll-like Receptors in Health and Disease**, p. 1-21, 2022.
- LEUNG, P.S. Overview of the pancreas. **Adv Exp Med Biol.**, v. 690, p.3-12, 2010.
- LI, Lan *et al.* Nuclear factor- κ B and I κ B kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 101, n. 10, p. 2351-2362, 2004.
- LI, Limin *et al.* Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. **Cancer research**, v. 51, n. 10, p. 2531-2535, 1991.
- LI, Mingzhi *et al.* Interaction between polysaccharides and toll-like receptor 4: Primary structural role, immune balance perspective, and 3D interaction model hypothesis. **Food Chemistry**, v. 374, p. 131586, 2022.
- LI, Shuhong *et al.* Purification, antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from soybean residue fermented with *Morchella esculenta*. **International journal of biological macromolecules**, v. 96, p. 26-34, 2017
- LI, Xinyan; JIANG, Song; TAPPING, Richard I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. **Cytokine**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2010.
- LIMA, Iásly C. *et al.* Galactomannan of *Delonix regia* seeds modulates cytokine expression and oxidative stress eliciting anti-inflammatory and healing effects in mice cutaneous wound. **International journal of biological macromolecules**, v. 203, p. 342-349, 2022.
- LINDHOLM, Heléne; EJESKÄR, Katarina; SZEKERES, Ferenc. Digitoxin affects metabolism, ROS production and proliferation in pancreatic cancer cells differently depending on the cell phenotype. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8237, 2022.
- LI, Qingqing *et al.* Binding of the polysaccharide from *Acanthopanax giraldii* Harms to toll-like receptor 4 activates macrophages. **Journal of ethnopharmacology**, v. 241, p. 112011, 2019.

- LIU, Ting et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.
- MCGUIGAN, Andrew et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 43, p. 4846, 2018.
- MANERO-RUPÉREZ, N. et al. The Galectin Family as Molecular Targets: Hopes for Defeating Pancreatic Cancer. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 689, 2020.
- MARQUES, F. da C.J. **Galactomanana de *Delonix regia* modula o influxo de CA2+ citosólico em célula acinar pancreática protegendo da necrose na pancreatite aguda experimental e induz apoptose em células tumorais de pâncreas**. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- MARTINEZ-BOSCH, N. et al. Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker. **Oncotarget.**, v. 9, n. 68, p.32984-32996, 2018.
- MARUCHA, Phillip T.; ZEFF, Richard A.; KREUTZER, Donald L. Cytokine regulation of IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 145, n. 9, p. 2932-2937, 1990.
- MCCARTHY, Edward F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. **The Iowa orthopaedic journal**, v. 26, p. 154, 2006.
- MODI, Shrey et al. Control of apoptosis in treatment and biology of pancreatic cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 279-288, 2016.
- MODI, Anuj et al. *Delonix regia*: historic perspectives and modern phytochemical and pharmacological researches. **Chinese journal of natural medicines**, v. 14, n. 1, p. 31-39, 2016.
- NETEA, Mihai G. et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67-78, 2008.
- NEWTON, Kim; DIXIT, Vishva M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 3, p. a006049, 2012.
- ORLACCHIO, Arturo; MAZZONE, Pellegrino. The role of toll-like receptors (TLRs) mediated inflammation in pancreatic cancer pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12743, 2021.
- ORTH, Michael et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. **Radiation Oncology**, v. 14, n. 1, p. 1-20, 2019.
- OZBEN, Tomris. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 9, p. 2181-2196, 2007.
- POLTORAK, A. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tl. **Science**, v. 282, p. 2205-2209, 1998.
- PONZ-SARVISE, M. et al. Identification of Resistance Pathways Specific to Malignancy Using Organoid Models of Pancreatic Cancer. **Clin Cancer Res.**, v.25,n.22, p.6742-6755, 2019.

- PRAMANIK, Kartick C.; BOREDDY, Srinivas Reddy; SRIVASTAVA, Sanjay K. Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e20151, 2011.
- PRINCIPE, Daniel R. et al. The current treatment paradigm for pancreatic ductal adenocarcinoma and barriers to therapeutic efficacy. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 688377, 2021.
- PUSAPATI, Madan R. et al. In vitro cytotoxic activity of hydro ethanolic extract of *Delonix regia* (Bojer ex. Hook.) flowers on cancer cell lines. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 4, p. 443-452, 2013.
- RAJPUT, Sandeep; VOLK-DRAPER, Lisa D.; RAN, Sophia. TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, n. 8, p. 1676-1687, 2013.
- REHLI, Michael et al. PU. 1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9773-9781, 2000.
- RODRIGUEZ-CANTO, W. et al. *Delonix regia* galactomannan hydrolysates: Rheological behavior and physicochemical characterization. **Carbohydr Polym.**, v. 206, p. 573-582, 2019.
- ROSENDAHL, Ann H. et al. Polysaccharide-K (PSK) increases p21WAF/Cip1 and promotes apoptosis in pancreatic cancer cells. **Pancreatology**, v. 12, n. 6, p. 467-474, 2012.
- QUISPE, C. C. **A Doxorrubicina e o Paclitaxel, usados na quimioterapia neoadjuvante para câncer de mama, ativam receptores toll-like e proteínas de sua sinalização, PI3K e AKT.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.
- SALEM, Mohamed ZM. Evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of stem bark extracts of *Delonix regia* and *Erythrina humeana* grown in Egypt. **J. Forest Prod. Ind.**, v. 2, n. 2, p. 48-52, 2013.
- SAMEER, Aga Syed et al. Toll-like receptors (TLRs): structure, functions, signaling, and role of their polymorphisms in colorectal cancer susceptibility. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.
- SEDLAK, Jozef; LINDSAY, Raymond H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.
- SHARMA, Priya et al. A comprehensive review on leguminous galactomannans: structural analysis, functional properties, biosynthesis process and industrial applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 443-465, 2021.
- SHEWALE, Vaishali D. et al. Anti-inflammatory activity of *Delonix regia* (boj. Ex. Hook). **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2012, 2012.
- SHOHAM, Shmuel et al. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **The journal of immunology**, v. 166, n. 7, p. 4620-4626, 2001.

- SIEGEL, Rebecca L. et al. Cancer statistics, 2023. **Ca Cancer J Clin**, v. 73, n. 1, p. 17-48, 2023.
- SILVA, G.C.da. **Distribuição espacial do flamboyant, espécie exótica da Mata Atlântica, no Câmpus I da Universidade Federal da Paraíba**. Monografia (Graduação em Geografia) Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2009.
- TAMAKI, Yukihiro; TERUYA, Takeshi; TAKO, Masakuni. The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 5, p. 1110-1112, 2010.
- TANSI, Felista L. et al. Identifying the Morphological and Molecular Features of a Cell-Based Orthotopic Pancreatic Cancer Mouse Model during Growth over Time. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 5619, 2024.
- THULER, Luiz Claudio Santos; SANT'ANA, Denise Rangel; REZENDE, Magda Côrtes Rodrigues. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. In: **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2011. p. 127-127.
- TOMITA, Tatsuo. New markers for pancreatic islets and islet cell tumors. **Pathology international**, v. 52, n. 7, p. 425-432, 2002.
- TREJO-DE LA O, A.; HERNÁNDEZ-SANCÉN, P.; MALDONADO-BERNAL, C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. **Genes & Immunity**, v. 15, n. 4, p. 199-209, 2014.
- ULLMAN, Nicholas A. et al. Immunologic strategies in pancreatic cancer: making cold tumors hot. **Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n. 24, p. 2789-2805, 2022.
- UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs, **Population Division. World population prospects: the 2015 revision, key findings and advance tables**. Working Paper ESA/P/WP 241. 2015.
- VAN HORSSSEN, Remco; TEN HAGEN, Timo LM; EGGERMONT, Alexander MM. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. **The oncologist**, v. 11, n. 4, p. 397-408, 2006.
- VAZ, Juan; ANDERSSON, Roland. Intervention on toll-like receptors in pancreatic cancer. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 19, p. 5808, 2014.
- VEIGAS, Jyothi M. et al. Antioxidative efficacies of floral petal extracts of *Delonix regia* Rafin. **Int J Biomed Pharm Sci**, v. 1, n. 1, p. 73-82, 2007.
- VIJAY, Kumar. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International immunopharmacology**, v. 59, p. 391-412, 2018
- WANDERLEY, Carlos W. et al. Paclitaxel reduces tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages to an M1 profile in a TLR4-dependent manner. **Cancer research**, v. 78, n. 20, p. 5891-5900, 2018.
- WANG, Lintao et al. Doxorubicin-induced systemic inflammation is driven by upregulation of toll-like receptor TLR4 and endotoxin leakage. **Cancer research**, v. 76, n. 22, p. 6631-6642, 2016.

- WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (ed.) **World cancer report: cancer research for cancer prevention**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: setembro. 2023.
- WOOD, Laura D. et al. Pancreatic cancer: pathogenesis, screening, diagnosis, and treatment. **Gastroenterology**, v. 163, n. 2, p. 386-402. e1, 2022.
- XIE, Jian-Hua et al. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. sup1, p. S60-S84, 2016.
- XIE, Liuming et al. Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 115436, 2020.
- XIE, Song-Zi et al. Polysaccharide of *Dendrobium huoshanense* activates macrophages via toll-like receptor 4-mediated signaling pathways. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 292-300, 2016.
- YANG, J. et al. Chemical modification, characterization and structure-anticoagulant activity relationships of Chinese lacquer polysaccharides. **Int J Biol Macromol.**, v.31,n.3, p.55-62, 2002.
- YIP-SCHNEIDER, Michele T. et al. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 2, p. 139-146, 2000.
- YU, Yue et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 183, p. 91-101, 2018.
- ZHANG, Min et al. A polysaccharide component from *Strongylocentrotus nudus* eggs inhibited hepatocellular carcinoma in mice by activating T lymphocytes. **Oncology Letters**, v. 13, n. 3, p. 1847-1855, 2017.
- ZHANG, Xiaorui et al. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models. **Carbohydrate polymers**, v. 149, p. 186-206, 2016.
- ZHANG, Ziqi et al. Involvement of inflammasomes in tumor microenvironment and tumor therapies. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 16, n. 1, p. 24, 2023.
- ZIDI, Inès et al. TNF- α e seus inibidores no câncer. **Oncologia Médica** , v. 27, pág. 185-198, 2010.