

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELE LUISE NEVES ALVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO POLISSACARÍDEO SULFATADO
FUCANA B, EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA *Spatoglossum schröderi*, EM
MODELO DE MELANOMA MURINO *IN VITRO***

CURITIBA
2016

GABRIELE LUISE NEVES ALVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO POLISSACARÍDEO SULFATADO
FUCANA B, EXTRAÍDO DA ALGA MARINHA *Spatoglossum schröderi*, EM
MODELO DE MELANOMA MURINO *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso II (Monografia)
apresentado ao curso de Biomedicina, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em BIOMEDICINA.

Orientação: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA
2016

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindadade, pela orientação e pela oportunidade de trabalhar na presente pesquisa, junto aos demais membros do LCIN e do LIPS.

À Prof^a. Dr^a. Célia Regina Cavicchiolo Franco, por prontamente aceitar os convites para participar das bancas de projeto e TCC desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Carolina Camargo de Oliveira, pela paciência em orientar-me em momentos de incerteza durante a execução do trabalho de pesquisa.

Aos pós-doutorandos Ana Helena e Thiago, pelo auxílio com os ensaios de zimografia e expressão gênica, respectivamente, além da disposição para o esclarecimento de diversas dúvidas.

Aos doutorandos Jenifer e Daniel, pelo apoio com protocolos, padronizações e diversas orientações fundamentais para a realização do presente trabalho; bem como ao doutorando Gustavo, pela revisão do projeto de pesquisa e apoio em geral.

Às colegas de graduação Mallu e Viviana, pela parceria em vários experimentos.

A todos os membros do LCIN e do LIPS, pela troca de ideias e informações.

À Prof^a. Dr^a. Janaína Menezes Zanoveli, do Departamento de Farmacologia da UFPR, pela ajuda com as análises estatísticas dos resultados.

Aos colegas do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal, Lisandra, Israel e Alessandra.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais, UFRN, pelo fornecimento da amostra do polissacarídeo fucana B.

À coordenação e aos professores do curso de Biomedicina da UFPR, pelo suporte durante toda a graduação.

Aos familiares e amigos, pelo apoio sempre presente.

À CAPES, pelo auxílio financeiro à pesquisa e pela bolsa de Iniciação Científica.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

O melanoma é a forma mais letal de câncer de pele, apresentando resistência aos tratamentos disponíveis quando em estágio avançado. Uma abordagem desejável para o tratamento do melanoma é o desenvolvimento de estratégias farmacológicas não citotóxicas, a fim de diminuir os efeitos colaterais deletérios da medicação e aumentar a sobrevida do paciente. Um aspecto importante na configuração do quadro da doença a ser explorado é a interação das células do melanoma com o microambiente que o circunda, em especial, com os componentes da matriz extracelular. A fucana B, um polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha *Spatoglossum schröderi*, dada sua estrutura química, apresenta-se como uma candidata para estudos na busca por tratamentos alternativos contra o melanoma. O objetivo geral deste trabalho, portanto, foi avaliar a ação da fucana B sobre o comportamento de células B16F10 (modelo de melanoma murino) em relação a características do perfil metastático desse tipo de tumor. Os resultados de testes *in vitro* apontaram que a fucana B, nas concentrações testadas (entre 0,1 e 100 µg/ml), não altera os parâmetros de proliferação e viabilidade celular e não é citotóxica. Além disso, o mesmo polissacarídeo, na concentração de 100 µg/ml, foi capaz de reduzir a capacidade de migração das células. No entanto, a análise da expressão gênica das metaloproteinases *MMP2*, *MMP9* e *MMP14*, bem como de seus inibidores *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *RECK* não mostrou-se alterada. Os resultados sugerem que ensaios ainda são necessários para elucidar a questão, mas a fucana B pode ser um composto interessante para inibir o perfil metastático em melanomas, sem apresentar citotoxicidade.

Palavras-chave: Melanoma murino. B16F10. Fucana B. *Spatoglossum schröderi*. Migração. Atividade biológica.

ABSTRACT

Melanoma is the most lethal form of skin cancer, exhibiting resistance to available treatments when in advanced stages. A desirable approach for the treatment of melanoma is the development of non-cytotoxic pharmacological strategies in order to decrease the deleterious side effects of the medication and increase the patient's survival. An important aspect in the configuration of the disease to be explored is the interaction of the melanoma cells with the surrounding microenvironment, especially with the components of the extracellular matrix. Fucana B, a sulfated polysaccharide extracted from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi*, given its chemical structure, is a candidate for studies in the search for alternative treatments against melanoma. Therefore, the general objective of this work was to evaluate the action of fucana B on the behavior of B16F10 cells (murine melanoma model) in relation to characteristics of the metastatic profile of this type of tumor. The results of *in vitro* tests indicated that fucana B, at the concentrations tested (between 0.1 and 100 µg/ml), does not alter proliferation and cell viability parameters and is non-cytotoxic. In addition, the same polysaccharide, at the concentration of 100 µg/ml, was able to reduce the cells migration capacity. However, the gene expression analysis of metalloproteinases *MMP2*, *MMP9* and *MMP14*, as well as their inhibitors *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* and *RECK* was not altered. The results suggest that further assays are still needed to elucidate the issue, but fucana B may be an interesting compound to inhibit the metastatic profile in melanomas, without presenting cytotoxicity.

Keywords: Murine melanoma. B16F10. Fucana B. *Spatoglossum schröderi*. Migration. Biological activity.

SUMÁRIO

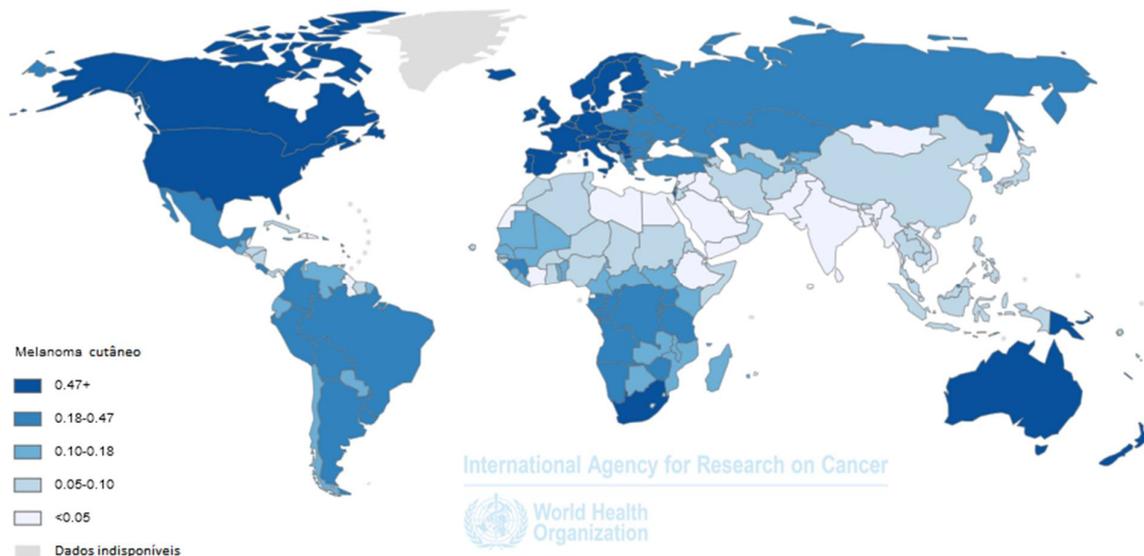
1	INTRODUÇÃO	7
1.1	MELANOMA.....	7
1.2	MOLÉCULAS-CHAVE EM MELANOMAS.....	13
1.3	POTENCIAL ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3	JUSTIFICATIVA	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	CULTIVO CELULAR.....	23
4.2	TRATAMENTO DAS CÉLULAS.....	23
4.3	VIABILIDADE CELULAR: VERMELHO NEUTRO.....	23
4.4	CITOTOXICIDADE CELULAR: MTT.....	24
4.5	PROLIFERAÇÃO CELULAR: CRISTAL VIOLETA.....	24
4.6	MIGRAÇÃO CELULAR: <i>SCRATCH</i>	25
4.7	EXPRESSÃO GÊNICA: RT-qPCR.....	26
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	VIABILIDADE, CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	27
5.2	MIGRAÇÃO CELULAR.....	29
5.3	EXPRESSÃO GÊNICA.....	30
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32
	APÊNDICE 1 – ENSAIO DE MIGRAÇÃO COMPLETO	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O câncer de pele é um dos tipos mais frequentes de câncer, responsável por um em cada três novos casos diagnosticados de neoplasias no mundo. O câncer de pele pode ser classificado em dois tipos: melanoma e não melanoma. A incidência anual de câncer de pele é de cerca de 2,5 milhões de casos, sendo mais de 130 mil destes, do tipo melanoma (WHO, 2016) (FIGURA 1). No Brasil, estima-se a ocorrência de novos melanomas em mais de 5.670 pessoas entre 2016 e 2017 (INCA, 2016).

FIGURA 1 – INCIDÊNCIA MUNDIAL DO MELANOMA CUTÂNEO



Fonte: Modificado de WHO (2012).

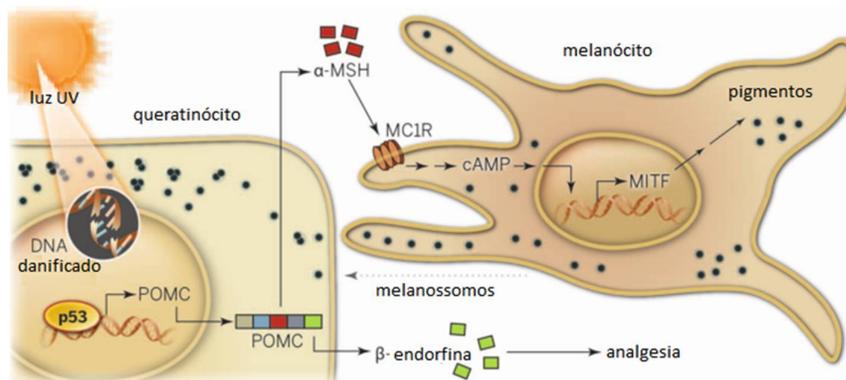
LEGENDA: Distribuição mundial do câncer de pele do tipo melanoma cutâneo. A classificação da incidência da doença no mundo é mostrada de forma gradativa pelas cores no mapa, correlacionando-as ao número de novos casos a cada 100.000 habitantes, por ano, incluindo-se um valor de taxa padronizada por idade (ASR).

O melanoma é a forma de câncer de pele com maior mortalidade (20% dos casos diagnosticados são fatais), sendo responsável por 80% das mortes por câncer de pele no mundo (DAMSKY et al., 2014; PALUNCIC et al., 2016) e, ainda que atualmente haja um potencial curativo maior, o prognóstico para a doença costuma ser ruim, pois o histórico do melanoma é de resistência ao tratamento, principalmente em estágios avançados, quando há metástase (SAITO et al., 2015).

O câncer de pele do tipo melanoma origina-se a partir dos melanócitos, células derivadas da crista neural, localizadas em baixa densidade na epiderme, com também baixa taxa de divisão (menos de duas vezes ao ano). Estas células produzem dois tipos de pigmentos, a eumelanina (marrom/preta) e a feomelanina (amarela/vermelha). A eumelanina, que possui uma pigmentação basal, fornece uma proteção cutânea atenuante à radiação ultravioleta (UV), sendo a própria radiação UV emitida por raios solares um estímulo extra para a sua síntese (LO; FISHER, 2014).

Melanócitos possuem receptores MC1R, que induzem a proliferação e a produção de melanina quando ativados pelo hormônio α MSH, produzido por queratinócitos expostos à radiação UV em níveis danosos ao material genético das células. A melanina produzida por melanócitos é direcionada aos queratinócitos, onde se dispersa e absorve a radiação UV, protegendo-os contra danos ao DNA (SHAIN; BASTIAN, 2016) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – RESPOSTA DE CÉLULAS CUTÂNEAS À EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA



FONTE: Modificado de LO; FISHER (2014).

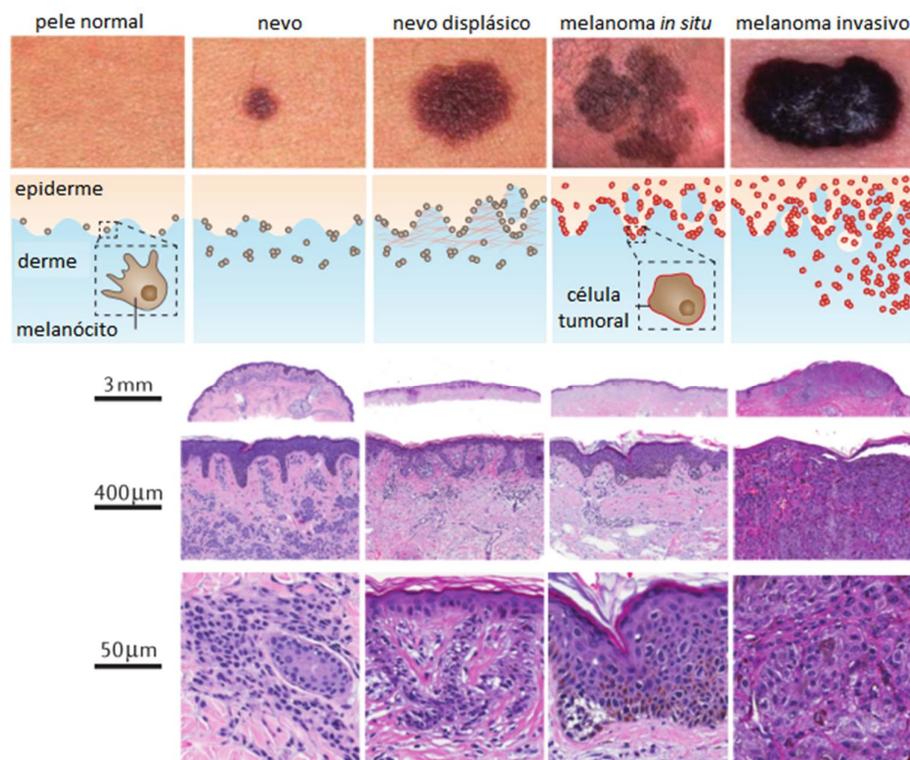
LEGENDA: Esquema da síntese de melanina em resposta a um dano causado no DNA por ação da radiação UV. A luz UV em níveis danosos ao DNA ativa a proteína p53 em queratinócitos, levando à expressão de pró-opiomelanocortina (POMC), molécula precursora do hormônio estimulante de melanócitos (MSH), que, quando secretado, liga-se ao receptor de melanocortina 1 (MCR1) em melanócitos, ativando via de sinalização mediada por cAMP e, por consequência, MITF (fator de transcrição associado à microftalmia), que promove a formação de melanina, então transportada por melanossomos aos queratinócitos, protegendo-os contra a ação da radiação UV no material genético.

Em condições fisiológicas regulares, a homeostase da epiderme humana é mantida por uma relação simbiótica entre unidades formadas por um melanócito associado a cerca de 36 queratinócitos (JIMBOW et al., 1976). Um desbalanço da proporção entre melanócitos e queratinócitos, e a proliferação contínua dos primeiros, dependendo do curso patológico, pode resultar no desenvolvimento do melanoma (HAASS; HERLYN, 2005).

Em seres humanos, nevos neoplásicos característicos de melanomas são mais comuns na epiderme em áreas do corpo expostas à radiação UV solar, tais como cabeça, pescoço e porção dorsal das extremidades, principalmente em indivíduos com mais de 55 anos de idade. Porém, os melanócitos também estão presentes nos folículos capilares, nos olhos, nas meninges, no trato anogenital e outros tecidos. Sob diferentes estímulos, antes dos 55 anos de idade, também pode haver o desenvolvimento de neoplasias nestes locais, com variações clínicas importantes em relação aos melanomas cutâneos (SHAIN; BASTIAN, 2016).

A transformação de melanócitos no desenvolvimento de melanomas é um processo complexo, com etapas nem sempre contínuas. A evolução e os estágios da doença são muito heterogêneos, dependendo da exposição a fatores de risco e do genótipo dos indivíduos. A classificação de neoplasias do tipo melanoma costuma ter como base a progressão da lesão, variando desde uma neoplasia benigna (nevo) até uma neoplasia maligna (metastática) (SHAIN; BASTIAN, 2016) (FIGURA 3).

FIGURA 3 – ESPECTRO MORFOLÓGICO DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS

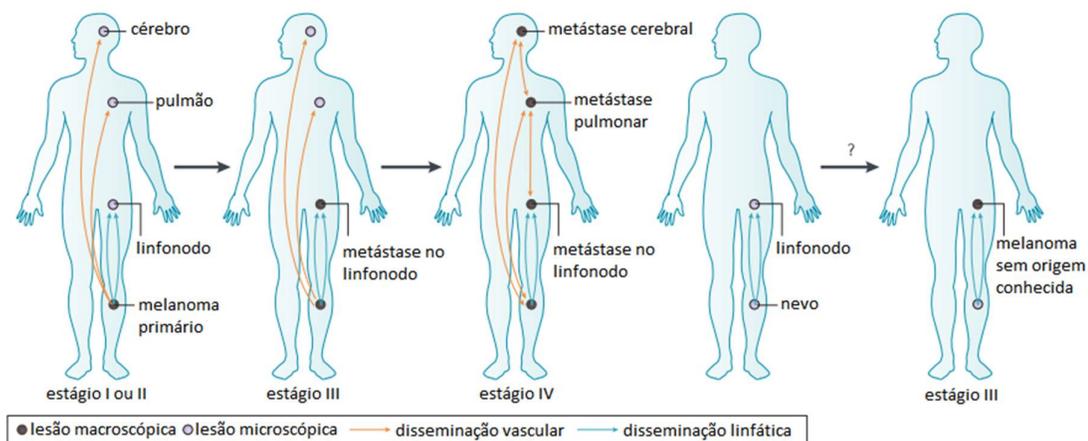


FONTE: Modificado de SHAIN; BASTIAN (2016).

LEGENDA: Imagens ilustrativas de diferentes estágios do desenvolvimento de melanomas. Nevo benigno: proliferação alterada de melanócitos. Displasia: agregação de melanócitos. Proliferação intraepidermal (*in situ*): crescimento radial. Invasão da derme e do tecido subcutâneo: crescimento vertical. Metástase: disseminação maligna em tecidos distantes.

Quando ocorre o processo de invasão tecidual, as células neoplásicas do melanoma avançam para o tecido mesenquimal adjacente à epiderme, na derme ou na submucosa. Mas apenas a invasão da derme não configura a metástase. O processo de metástase caracteriza-se pela colonização de tecidos fora do local primário do tumor, sendo os linfonodos, bem como pulmões, cérebro e ossos, áreas comuns para a disseminação metastática. Uma pequena parcela dos tumores metastáticos aparece sem que seja observado inicialmente um tumor primário macroscópico (SHAIN; BASTIAN, 2016) (FIGURA 4).

FIGURA 4 – MODELOS DE MELANOMA METASTÁTICOS



FONTE: Modificado de SHAIN; BASTIAN (2016).

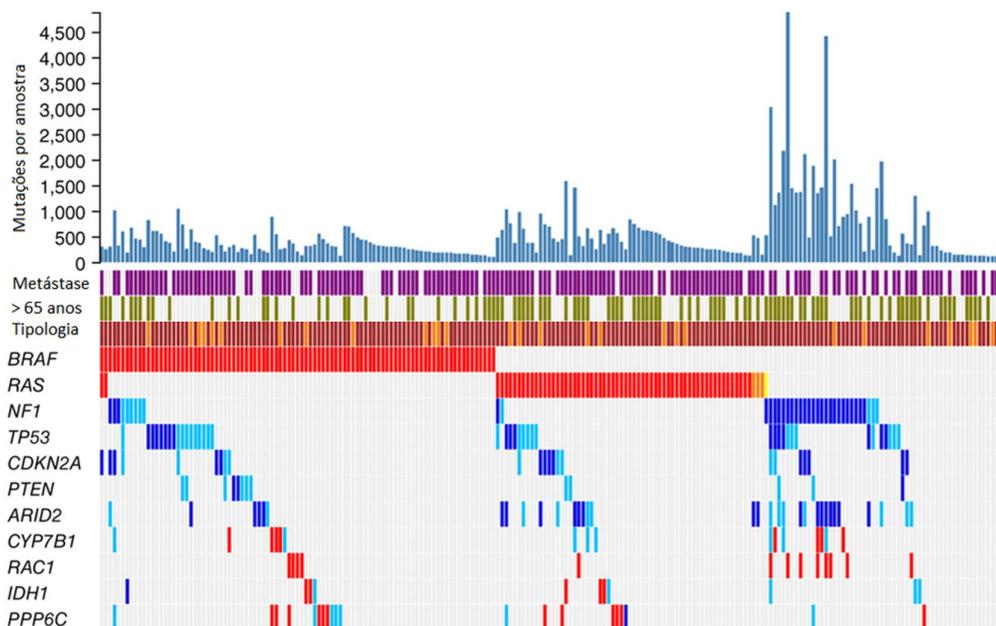
LEGENDA: Diferentes formas de disseminação tecidual em melanomas. O melanoma não apresenta um curso discreto, podendo ocorrer a disseminação maligna microscópica para tecidos distantes e linfonodos a partir de uma lesão primária macroscópica (estágio I ou II); disseminação maligna microscópica para tecidos distantes e/ou macroscópica para linfonodos a partir de uma lesão primária macroscópica, ou disseminação maligna macroscópica para linfonodos diretamente a partir de uma lesão microscópica (estágio III); ou disseminação maligna macroscópica para tecidos distantes e linfonodos a partir de uma lesão primária macroscópica (estágio IV). Em alguns casos particulares pode ainda ocorrer metástase para os linfonodos, sem a identificação de uma lesão primária (estágio III).

Os principais fatores de risco para o melanoma cutâneo são o histórico familiar, a presença de muitos nevos, pele clara, imunossupressão e exposição à radiação UV. Os efeitos da radiação ultravioleta na pele incluem alterações genéticas, indução de espécies reativas de oxigênio, alteração da função imunológica cutânea e indução da produção de fatores de crescimento (LO; FISHER, 2014).

Melanomas em estágios avançados acumulam mutações somáticas em diversos genes, tais como naqueles envolvidos nos processos celulares de proliferação (*BRAF*, *NRAS* e *NF1*), crescimento e metabolismo (*PTEN* e *KIT*), resistência à apoptose (*TP53*), controle do ciclo celular (*CDKN2A*), entre outros

(FIGURA 5). Sugere-se que uma mutação isolada do gene *BRAF*, alteração presente em cerca de 50% de todos os casos de melanoma (KRAUTHAMMER et al., 2015), já seja suficiente para a formação de um nevo neoplásico (SHAIN; BASTIAN, 2016). Além disso, mais recentemente, estudos revelaram também a superexpressão de alguns microRNAs oncogênicos no desenvolvimento de melanomas (KUNZ, 2013, 2014).

FIGURA 5 – MUTAÇÕES GENÉTICAS RELACIONADAS A MELANOMAS



FONTE: Modificado de KRAUTHAMMER et al. (2015).

LEGENDA: O esquema ilustra os 11 principais genes envolvidos no desenvolvimento de melanomas. Roxo: melanoma metastático. Verde: pacientes acima de 65 anos. Marrom e laranja: exposição solar como causa e causa desconhecida, respectivamente. Vermelho: mutações em posições recorrentes. Azul escuro: mutações inativantes. Azul claro: mutações prejudiciais.

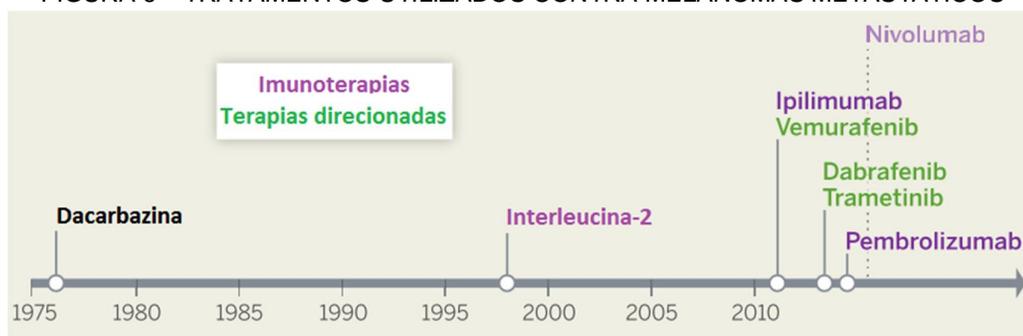
Grande parte das mutações em genomas relacionadas ao melanoma é oriunda de efeitos da radiação UVB, mas algumas mutações importantes estão relacionadas a estresse oxidativo associado à radiação UVA, que é absorvida pela feomelanina, provocando amplificação de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, lesões no DNA. Portanto, ambos os tipos de radiação UV são fatores de risco para o desenvolvimento de melanomas (LO; FISHER, 2014).

O melanoma cutâneo em estágio avançado é difícil de tratar, pois as células desse tipo de tumor sobrevivem mesmo em condições extremas em seu microambiente e apresentam uma grande instabilidade genômica (SAITO et al., 2015). Os tratamentos farmacológicos disponíveis contra melanomas não tem sido eficientes

na contenção da mortalidade provocada pela doença e costumam ser seguidos do surgimento de mecanismos de resistência às drogas e progressão da patologia, com uma sobrevida média menor do que um ano (LO; FISHER, 2014).

Além de cirurgias de remoção de tumores primários, terapias atuais contra melanomas incluem, isoladamente ou em combinações: quimioterápicos citotóxicos (dacarbazina), imunoterapias (altas doses de interleucina-2, ou anticorpos ipilimumab, pembrolizumab e nivolumab), inibidores da enzima *BRAF* (vemurafenib e dabrafenib) e inibidores de promotores de crescimento e sobrevivência celular (trametinib) (LO; FISHER, 2014) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – TRATAMENTOS UTILIZADOS CONTRA MELANOMAS METASTÁTICOS



FONTE: Modificado de LO; FISHER (2014).

LEGENDA: Tratamentos contra melanomas metastáticos colocados na linha do tempo de acordo com o ano de aprovação pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration).

Alguns dos mecanismos intrínsecos e extrínsecos de resistência a tratamentos (excluindo-se os anticorpos) que células de melanoma são capazes de desenvolver incluem adaptação a estresse relacionado ao retículo endoplasmático e ao mal dobramento de proteínas, bem como reprogramação metabólica, quimioresistência, eliminação de fármacos e transferência de oncogenes e de outras moléculas que modulam a resistência tumoral (SAITO et al., 2015). Muitas drogas quimioterápicas rotineiramente utilizadas para o tratamento de melanomas induzem apoptose nas células, logo, mecanismos de resistência à morte celular também comprometem o efeito destes medicamentos durante o processo de progressão da doença (GRAY-SCHOPFER et al., 2007).

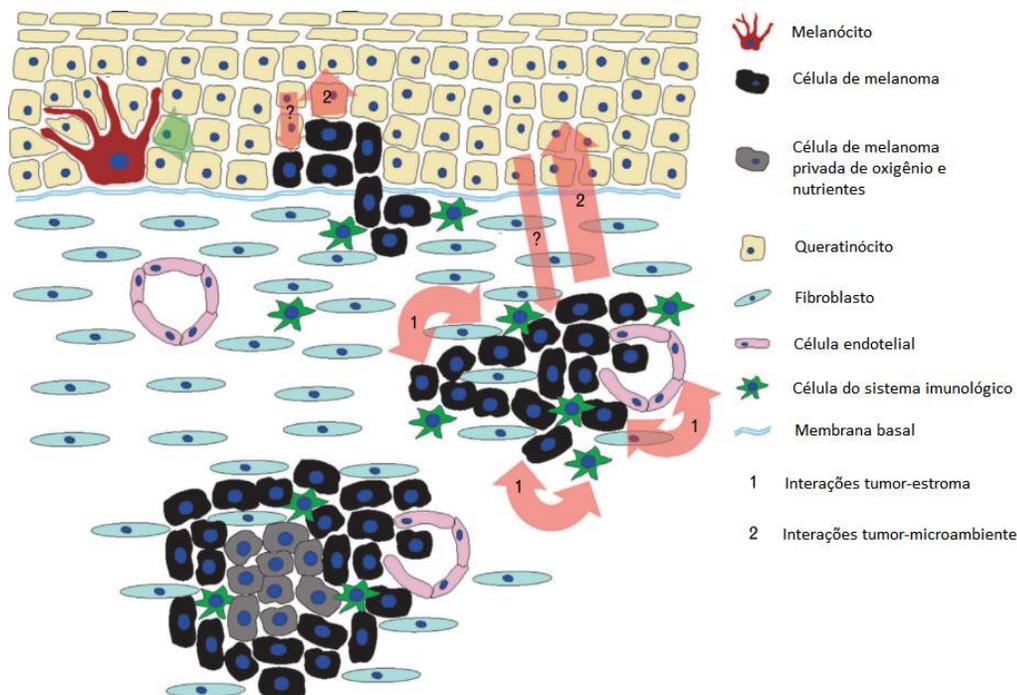
Uma abordagem desejável para o tratamento de melanomas é o uso de agentes farmacológicos que afetem diferentes mecanismos e vias de sinalização em células tumorais, com menos efeitos citotóxicos e maior especificidade. A inibição da angiogênese isoladamente, por exemplo, pode não ser efetiva para um tratamento

satisfatório, mas aliada à alvos que afetem a adesão celular, como integrinas, pode representar o caminho para um terapia farmacológica de alto impacto (GRAY-SCHOPFER et al., 2007).

1.2 MOLÉCULAS-CHAVE EM MELANOMAS

Mutações genéticas, induzidas ou não pela exposição à radiação UV, e suas consequências na desregulação de processos celulares de crescimento, sobrevivência, angiogênese, apoptose, proliferação, migração e resistência quimioterápica são importantes na compreensão dos mecanismos de desenvolvimento do melanoma (VAN DEN HURK et al., 2012). No entanto, além das alterações genéticas, o microambiente tumoral, no qual estão presentes fibroblastos e células do sistema imunológico, entre outros componentes (FIGURA 7), também é determinante na formação do tumor primário e no processo de colonização de tecidos em órgãos secundários, que configura a metástase (FIDLER, 2003).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DO MICROAMBIENTE TUMORAL E INTERAÇÕES CELULARES



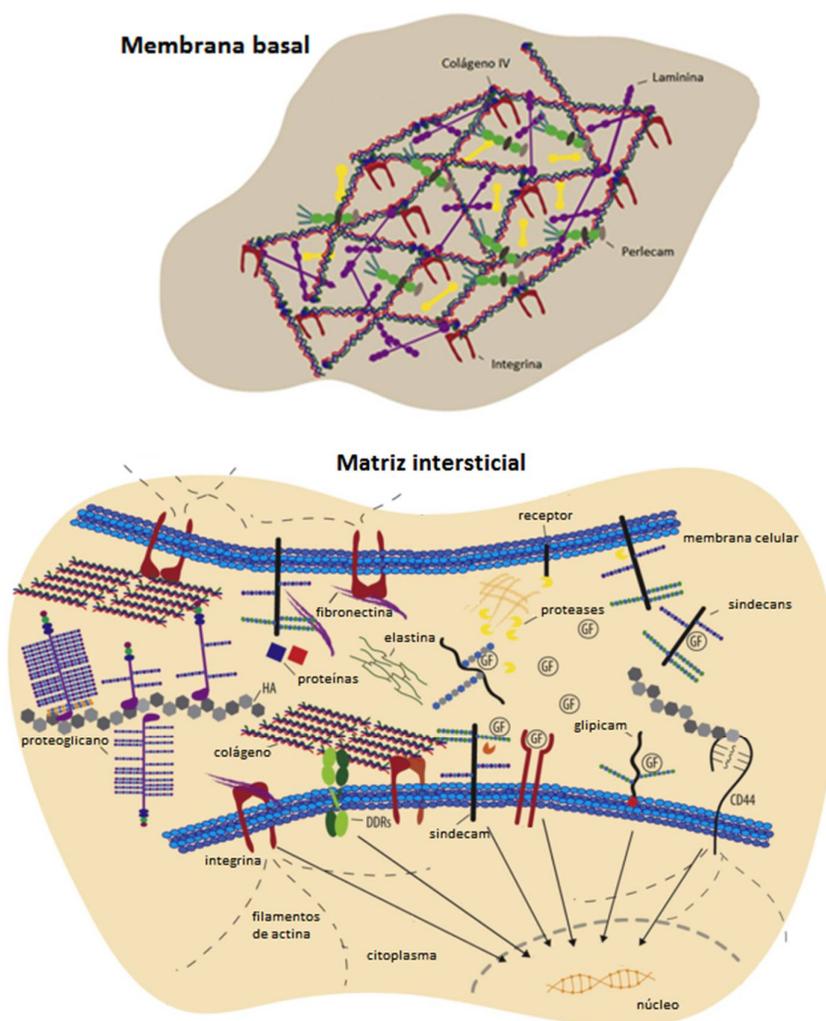
FONTE: Modificado de BRANDNER; HAASS (2013).

LEGENDA: Esquema simplificado das interações celulares no microambiente tumoral de melanomas. Quando presentes, as células do melanoma regulam o microambiente tumoral. É provável que queratinócitos controlados por células tumorais favoreçam o desenvolvimento do melanoma (relação indicada pelo sinal de interrogação "?" nas setas).

As condições de homeostase, e também as de um estado patológico, são mantidas no âmbito molecular por vias de comunicação celular endócrinas e parácrinas (com a participação de hormônios, fatores de crescimento e citocinas) e também por interações célula-célula e célula-matriz extracelular (HAASS et al., 2005).

Outro aspecto importante na configuração do quadro da doença é a interação das células neoplásicas com os componentes da matriz extracelular (MEC), que contém componentes moleculares que interagem entre si e com as células, regulando e modulando as funções destas, em um ambiente dinâmico (VILLANUEVA; HERLYN, 2008) (FIGURA 8).

FIGURA 8 – COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR



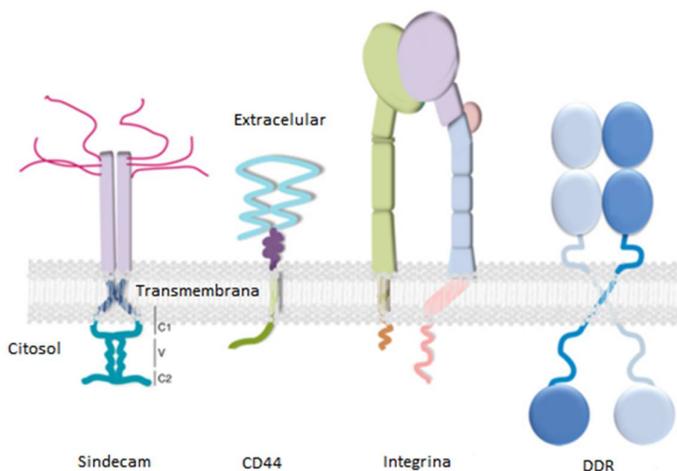
FONTE: Modificado de THEOCHARIS et al. (2016).

LEGENDA: Figuras esquemáticas dos componentes da membrana basal e da matriz intersticial em condições fisiológicas. As células ligam-se aos componentes da matriz extracelular por receptores, como integrinas, proteoglicanos e receptores de domínio de discoidina. Fatores de crescimento (GF) ligam-se a proteoglicanos da matriz extracelular intersticial e são liberados após a degradação desta.

Estão presentes na matriz extracelular: colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina, laminina e muitas outras glicoproteínas (THEOCHARIS et al., 2016). A MEC tem papel na adesão de moléculas e receptores e também no sequestro ou ativação de fatores de crescimento. É possível concluir, portanto, que os componentes da matriz extracelular ao redor de um tumor podem exercer influência ativa na inibição ou estimulação de processos de adesão e migração de células tumorais, contribuindo para a contenção ou disseminação da doença (NIKITOVIC et al., 2014). As células respondem não apenas aos seus ligantes específicos, como glicoproteínas, fibronectina e colágeno, mas também à rigidez da matriz extracelular (MULTHAUPT et al., 2016; THEOCHARIS et al., 2016).

Algumas das principais classes de receptores celulares de membrana para moléculas da matriz extracelular são os proteoglicanos transmembrânicos, como sindecans e CD44, as integrinas e os receptores de domínio de discoidina (DDR) (FIGURA 9).

FIGURA 9 – DIAGRAMA TOPOGRÁFICO DE RECEPTORES CELULARES DE MEMBRANA



FONTE: Modificado de MULTHAUPT et al. (2016).

LEGENDA: Receptores celulares de membrana para moléculas da matriz extracelular: sindecam, CD44, integrina e receptor de domínio de discoidina (DDRs).

As integrinas são moléculas que estão presentes em quase todas as células nucleadas e medeiam interações celulares com a matriz extracelular, sendo determinantes no microambiente tumoral (MULTHAUPT et al., 2016). Já os receptores de domínio de discoidina (DDRs) são receptores de tirosina quinase que funcionam como receptores de colágeno, regulando processos de proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celulares (LEITINGER, 2014). Por outro lado,

proteoglicanos de membranas celulares, como sindecans e CD44, são moléculas-chave para o entendimento de diversos processos celulares, incluindo a migração e a invasão tecidual (NIKITOVIC et al., 2014).

Os proteoglicanos de membranas celulares possuem um esqueleto proteico principal com cadeias laterais de glicosaminoglicanos (que possuem característica negativa) ligados covalentemente. Em mamíferos, foram identificados apenas cinco glicosaminoglicanos associados proteoglicanos de membranas: ácido hialurônico, condroitim sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e heparam sulfato (MULTHAUPT et al., 2016).

Dentre os proteoglicanos de interesse em melanomas, destacam-se os proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS), que são formados por um esqueleto proteico ao qual encontra-se ligadas covalentemente cadeias de heparam sulfato. A interação desse composto pode se dar tanto pela parte proteica, quanto pelas cadeias sacarídicas. Nesse caso, a especificidade do glicosaminoglicano heparam sulfato ao ligante é dependente do seu padrão de sulfatação e do tamanho da sua cadeia. Vale destacar que PGHS estão localizados na membrana celular, mas também são encontrados na matriz extracelular, onde também podem interagir com ligantes, participando de eventos como adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (NIKITOVIC et al., 2014).

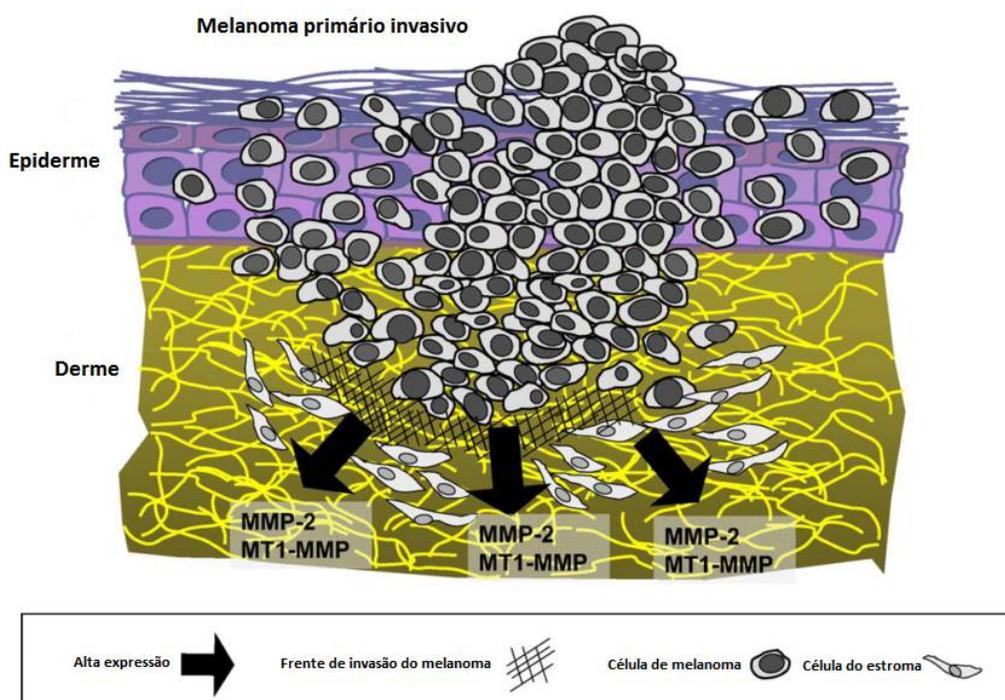
Os receptores sindecans são PGHS que possuem domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático, participando ativamente da condução de sinais extra e intracelulares e do sequestro e ligação de proteínas, modulando a homeostase tecidual e regulando os processos de transformação e progressão maligna em tumores, incluindo melanomas (BISHOP et al., 2007). Já moléculas de CD44 são proteoglicanos facultativos, isto é, podem ou não conter moléculas de glicosaminoglicanos covalentemente ligadas, e possuem variantes associadas à progressão de tumores (GÜNTHERT et al., 1991). A principal função do CD44 é de receptor para o ácido hialurônico, outro tipo de glicosaminoglicano, que não forma proteoglicano, mas cuja ligação ao CD44 auxilia no processo de migração celular (JIANG et al., 2011).

O desenvolvimento tumoral até o estágio metastático pode ainda ser regulado por enzimas proteolíticas, como metaloproteinases (MMPs), que degradam membranas basais e remodelam a matriz extracelular (FIGURA 10). Em geral, uma atividade aumentada de MMPs permite e facilita a invasão tecidual e,

consequentemente, o processo de metástase, pelas células de melanoma (MORO et al., 2014).

As MMPs são uma família de endopeptidases zinco-dependentes produzidas por diversas linhagens celulares, que degradam diferentes componentes da matriz extracelular e possuem também outras atividades biológicas, tais como: interação com proteínas não componentes da matriz extracelular (fatores de crescimento e seus receptores), mediadores do processo apoptótico e moléculas de adesão celulares (integrinas) (SEFTOR et al., 1999).

FIGURA 10 – INVASÃO TECIDUAL MEDIADA POR MMPs



FONTE: Modificado de HOFMANN et al. (2005).

LEGENDA: Representação da ação primária de MMPs em melanomas. As metaloproteases MMP-2 e MT1-MMP são ativadoras de outras proteases e estão presentes em estágios iniciais da invasão celular.

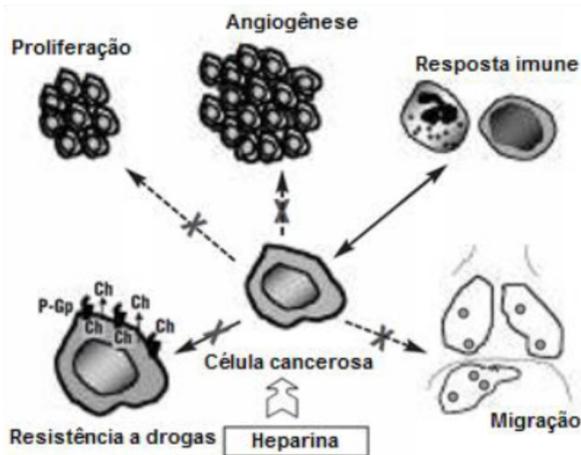
Duas das MMPs de interesse para estudo são as gelatinases MMP2 e MMP9, presentes na matriz pericelular, sendo a expressão destas moléculas em melanomas relacionada a baixas taxas de sobrevivência em humanos e metástase em estágios iniciais em camundongos, respectivamente (HOFMANN et al., 2005, 2003). Outra MMP, a MMP14, cliva o receptor CD44 e contribui para a migração até vasos endoteliais (BOSSERHOFF, 2011).

As MMPs são reguladas por uma família de proteínas endógenas chamadas TIMPs, composta por quatro membros (TIMP-1 a TIMP-4) (HOFMANN et al., 2005; LAMBERT et al., 2004). Outra molécula reguladora de MMPs é a RECK, uma glicoproteína ancorada a membrana, que é expressa por todas as células de mamíferos. Sua principal função é o remodelamento do tecido e controle da atividade de enzimas remodeladoras, como MMP2, MMP9 e MT1-MMP, podendo ainda atuar como um gene supressor de tumor, inibindo MMPs e a angiogênese tumoral (CLARCK et al., 2007; CHANG; HUNG; CHANG, 2008).

1.3 POTENCIAL ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Polissacarídeos sulfatados são um grupo de polímeros aniônicos presentes na natureza em uma grande variedade de organismos (ROCHA; COSTA; LEITE, 2011). Um dos tipos de polissacarídeos sulfatados mais estudados são as heparinas. A heparina não fracionada e a heparina de baixo peso molecular são polissacarídeos sulfatados de origem animal utilizados como drogas anticoagulantes, sendo o padrão de sulfatação determinante na atividade destes glicosaminoglicanos. Heparinas inibem os processos de metástase e angiogênese em diferentes tipos de tumores (ENGELBERG, 1999). Os mecanismos de ação destes compostos em melanomas são diversos, incluindo a modulação da atividade de moléculas como metaloproteases e heparanases (NIKITOVIC et al., 2014) (FIGURA 11).

FIGURA 11 – PROPRIEDADES ANTITUMORAIS JÁ EXPLORADAS DE HEPARINAS



FONTE: Modificado de LECUMBERRI; PÁRAMO; ROCHA (2005).

LEGENDA: Propriedades antitumorais de heparinas, independentes de atividade anticoagulante, sugeridas experimentalmente. Ch: Quimioterapia. P-GP: proteoglicano-glicoproteína.

O potencial antimetastático das heparinas depende da distinção entre suas atividades anticoagulante e anti-adesiva, sendo a segunda de maior interesse para a terapia tumoral, uma vez que a ação anticoagulante pode levar a sangramentos indesejados (SCHLESINGER et al., 2012).

Uma fonte alternativa, não animal, de polissacarídeos sulfatados são as algas marinhas (POMIN; MOURÃO, 2008). A atividade antitumoral das macromoléculas presentes nestes organismos, predominantemente polissacarídeos sulfatados, têm seu potencial explorado há séculos em regiões asiáticas (ROCHA; COSTA; LEITE, 2011). Mas o real potencial terapêutico destas macromoléculas têm sido mais ostensivamente explorado na atualidade, em razão do aprimoramento das técnicas de isolamento e análise estrutural dos compostos (WIJESEKARA et al., 2011; SENNI et al., 2011; WANG et al., 2014).

A estrutura dos polissacarídeos sulfatados oriundos de algas marinhas varia de acordo com a espécie de alga na qual estão presentes. As algas marinhas dividem-se em três grupos principais: rodófitas (algas vermelhas), feófitas (algas marrons) e clorófitas (algas verdes). Os principais polissacarídeos encontrados em rodófitas são galactanas e carragenanas, em feófitas, fucanas (moléculas polidispersas contendo L-fucose sulfatada), e em clorófitas, ulvanas e heteropolissacarídeos polidispersos (ROCHA; COSTA; LEITE, 2011; PATEL, 2012).

Algumas propriedades importantes já exploradas de polissacarídeos sulfatados oriundos de algas marinhas incluem atividade anticoagulante, antitrombótica, imunoestimulatória, antiviral e antitumoral. A atividade biológica e seus mecanismos de ação dependem da espécie de alga da qual foi extraída a macromolécula e do grau de sulfatação do composto envolvido (JIAO et al., 2011; WANG et al., 2014).

Estudos revelaram que polissacarídeos sulfatados podem apresentar atividade antiproliferativa contra células tumorais *in vitro*, atividade antimetastática, ação antiangiogênica, ação imunoestimulatória e antioxidante, induzir apoptose e diferenciação tumoral, inibir metaloproteinases e o crescimento tumoral em modelos animais. Alguns dos mecanismos de ação antitumorais propostos para os polissacarídeos sulfatados são a ligação direta a fatores de crescimento celular e moléculas de adesão, além da inibição da heparanase e liberação de fatores de crescimento sequestrados no tecido tumoral (WU; CHEN, 2006).

É muito difícil, no entanto, estabelecer uma relação entre características estruturais dos polissacarídeos sulfatados e suas atividades antitumorais, uma vez

que estas macromoléculas, independentemente da origem, não são sintetizadas nas mesmas condições controladas de outras biomoléculas, como ácidos nucleicos e proteínas (ROCHA; COSTA; LEITE, 2011).

Um tipo de polissacarídeo sulfatado de interesse farmacológico são as fucanas. Estes compostos são hidrossolúveis e estão presentes na matriz extracelular de algas marrons marinhas, possuindo como característica comum um esqueleto de fucose. Há, no entanto, grande heretogenicidade na estrutura destas macromoléculas entre diferentes espécies de algas (PATEL, 2012), o que afeta sua atividade biológica, inclusive a ação anticoagulante e antitrombótica (PEREIRA et al., 2002; JIAO et al., 2011).

A utilização farmacológica de polissacarídeos sulfatados de origem marinha, como as fucanas, pode representar uma alternativa à heparina (POMIN; MOURÃO, 2008), anticoagulante clássico, mas que depende de fontes animais (boi e porco) para ser adquirido – existindo, portanto, uma possibilidade de contaminação com prions e vírus (MOURÃO; PEREIRA, 1999).

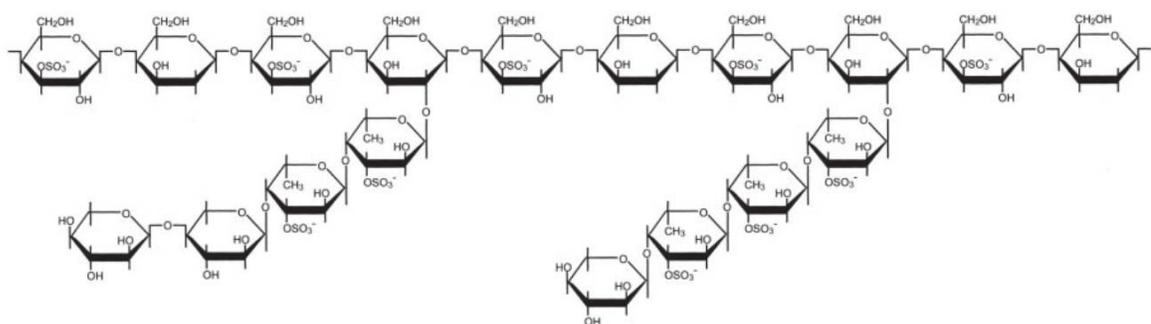
A alga marinha marrom *Spatoglossum schröderi* possui três frações de polissacarídeos sulfatados, denominados fucanas A, B e C. A fucana B apresenta características estruturais que a tornam um alvo promissor para uso farmacológico (FIGURA 12). Este polissacarídeo possui uma potente ação antitrombótica, sem efeito anticoagulante ou hemorrágico, sendo um candidato ideal para o combate a trombos venosos. O mecanismo de ação proposto para este efeito seria o estímulo da síntese de proteoglicanos de heparan sulfato antitrombótico nas células endoteliais da parede vascular (ROCHA et al., 2005a).

A fucana B também mostrou-se capaz de inibir a adesão de células tumorais de ovário de hamster (CHO-K1) e de uma variação mutante (CHO-745) à fibronectina, componente da matriz extracelular. O mecanismo proposto seria a ligação direta da fucana B sulfatada à fibronectina, impedindo a ligação de integrinas celulares, sendo essa atividade dependente de grupamentos sulfato, uma vez que a dessulfatação do composto anula seu efeito antiadesivo nessas células (ROCHA et al., 2005b).

A fucana B afeta ainda a proliferação e a migração de células CHO-K1 *in vitro*, de forma dose-dependente, de acordo com o grau de sulfatação do composto. Sugere-se que ocorra um bloqueio da progressão do ciclo celular (NOBRE et al., 2013).

A fucana B possui peso molecular de 21,5 kDa e contém fucose, xilose, galactose e sulfato na proporção molar 1:0,5:2:2, contendo ainda traços de ácido glucurônico. A estrutura básica da fucana B é formada por quatro unidades de β -galactose, parcialmente sulfatadas, sendo que cerca de 25% das unidades apresentam oligossacarídeos ligados – a maioria tetrassacarídeos compostos por α -fucose e β -xilose (ROCHA et al., 2005a) (FIGURA 12).

FIGURA 12 – ESTRUTURA PROPOSTA PARA A GALACTOFUCANA SULFATADA FUCANA B



FONTE: ROCHA et al. (2005a).

LEGENDA: Análises químicas, estudos de metilação e ressonância magnética nuclear revelaram a estrutura mais provável da fucana B, composta por um estrutura central de galactose, com uma porcentagem dessas galactoses sendo substituídas no carbono 2 por cadeia laterais formadas por fucose e xilose.

Resultados anteriores do grupo de pesquisa revelaram que os polissacarídeos sulfatados fucana A, fucana C, heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular não provocam morte celular e não são citotóxicos, mas reduzem características metastáticas, como potencial de invasão, em células de melanoma murino *in vitro* (SANTI, 2015), sendo que as fucanas A e C possuem ainda ação antitrombótica (ROCHA et al., 2005c; BARROSO et al., 2008). Tais resultados sugerem que a fucana B, compartilhando elementos estruturais com as fucanas A e C, e também apresentando ação antitrombótica, deva ter seu potencial antitumoral investigado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação *in vitro* do polissacarídeo sulfatado fucana B, extraído da alga marrom *Spatoglossum schröderi*, sobre células de melanoma murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar se o tratamento com fucana B possui ação direta nas células de melanoma murino, avaliando a capacidade citotóxica, bem como possíveis alterações na viabilidade e na proliferação celular;
- 2) Analisar se o tratamento pode causar alteração no processo de migração celular;
- 3) Identificar se o tratamento pode alterar a expressão de moléculas-chave características do perfil metastático de melanoma.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de todos os avanços farmacológicos das últimas décadas, o melanoma permanece entre os cânceres mais agressivos e resistentes aos tratamentos disponíveis em seres humanos (DAMSKY et al., 2014; SAITO et al., 2015; PALUNCIC et al., 2016).

Uma abordagem desejável para o tratamento de melanomas é desenvolver estratégias farmacológicas não citotóxicas, a fim de diminuir os efeitos colaterais deletérios, e que afetem diferentes vias biológicas, para evitar o desenvolvimento rápido de resistência tumoral (GRAY-SCHOPFER et al., 2007; SANTI, 2015).

Considerando o potencial antitumoral de polissacarídeos sulfatados, o fato de ser possível extrair estas biomoléculas de fontes renováveis e de origem não animal (MOURÃO; PEREIRA, 1999; BERTEAU; MULLOY, 2003), além de resultados anteriores com as fucanas A e C (ROCHA et al., 2005c; BARROSO et al., 2008; SANTI, 2015), a presente pesquisa buscou na fucana B uma ação terapêutica ótima

no combate ao processo metastático em um modelo de melanoma *in vitro*, a fim de sustentar estudos pré-clínicos posteriores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

A linhagem de melanoma murino B16F10 (ATCC® CRL-6322™), proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foi mantida em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo penicilina 1 U/mL, estreptomicina 1 µg/mL e anfotericina 2,5 µg/L, em atmosfera úmida a 37°C contendo 5% CO₂. O subcultivo dessas células foi realizado a cada três dias, utilizando tripsina.

4.2 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

Células B16F10 foram plaqueadas e mantidas por 24 horas. A seguir, o meio de cultura foi substituído por um novo e as células foram tratadas com o polissacarídeo sulfatado fucana B (cedido pelo Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN), diluído em meio DMEM, em concentração (0,1; 1; 10 e 100 µg/mL) e tempo variáveis (24, 48 e/ou 72 horas). No final do tratamento, as células foram submetidas aos experimentos, sempre comparadas ao controle (células não tratadas).

4.3 VIABILIDADE CELULAR: VERMELHO NEUTRO

As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços (4.000 células por poço para o tratamento de 24h, 2.000 para 48h e 1.000 para 72h), mantidas em incubadora de CO₂ e, após 24 horas em cultura, foram tratadas com a fucana B, conforme descrito no item 4.2. A seguir, duas horas antes do término do tempo de cada tratamento, foram adicionados 20 µL da solução mãe de vermelho neutro (1100 mg/mL) (N4638-1G, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EUA) nos poços com 200 µL de meio. Após duas horas de incubação, foi retirado o meio dos poços, adicionado 100 µL da solução de extração (1% de ácido acético em solução aquosa contendo

50% de etanol) e homogeneizado por 10 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à leitura da absorbância a 540 nm, em leitor de ELISA, utilizando o equipamento EpochTM Microplate Spectrophotometer (BioTek[®] Instruments, Inc.). A viabilidade celular é avaliada por meio da capacidade de acumular o corante em seu interior (BORENFREUND; PUERNER, 1985). Foram realizados três experimentos independentes, em triplicatas.

4.4 CITOTOXICIDADE CELULAR: MTT

O MTT é um sal de tratazólio de cor amarela o qual é convertido a um sal de formazam de cor roxa pela enzima succinato desidrogenase, ao longo da cadeia respiratória mitocondrial, e por outras desidrogenases celulares. Portanto, somente células com desidrogenases ativas são capazes de metabolizar o MTT em tetrazólio (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983). Assim, as células B16F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços como descrito no item 4.3, mantidas em incubadora de CO₂ e, após 24 horas, foram tratadas com a fucana B. A seguir, três horas antes do término do tempo de tratamento, foram adicionados 20 µL de solução de MTT (catálogo M5655, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EUA) 5 mg/mL, nos poços contendo 200 µL de meio e as células foram incubadas por três horas. Ao final da incubação, foi retirado o meio de cultura e adicionado 100 µL de DMSO 100% e homogeneizado por 10 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à leitura da absorbância a 570 nm, em leitor de ELISA, utilizando o equipamento EpochTM Microplate Spectrophotometer (BioTek[®] Instruments, Inc.). Foram realizados três experimentos independentes, em triplicatas.

4.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR: CRISTAL VIOLETA

As células B16F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços como descrito no item 4.3, mantidas em incubadora de CO₂ e, após 24 horas, foram tratadas com a fucana B. Após o tempo de tratamento (conforme descrito no item 4.2), as células foram lavadas com PBS, sendo posteriormente fixadas, pela adição de 50 µL por poço de paraformaldeído a 2% (em PBS) por 30 minutos. A seguir, a solução fixadora foi removida e as células foram incubadas por 10 minutos com 100 µL de solução de cristal violeta (263301, E.M.S, Hatfield, PA, EUA) a 0,25 mg/mL em água destilada.

Posteriormente, a solução de coloração foi descartada, as células lavadas duas vezes com 150 μL de água destilada e eluídas com 100 μL de ácido acético a 33% em água, por 10 minutos. As placas foram submetidas à leitura da absorbância à 570 nm, em leitor de ELISA, utilizando o equipamento EpochTM Microplate Spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc.). As células internalizam o corante e é possível comparar o aumento ou diminuição da proliferação celular, de acordo com a análise colorimétrica escolhida (ITAGAKI et al., 1991; SAOTOME et al.; 1989). Foram realizados três experimentos independentes, em triplicatas.

4.6 MIGRAÇÃO CELULAR: *SCRATCH*

Para avaliar a capacidade de migração das células foi realizado o método de *scratch* (LIANG; PARK; GUAN, 2007), com adaptações. Esse método consiste em avaliar a capacidade migratória após a remoção de uma camada de células aderentes da placa de cultura. Para tanto, células B16F10 foram plaqueadas em lamínulas aderida em placas de Petri de 35 mm de diâmetro, com quatro cavidades (Grainner Bio One, Kremsmunster, Austria) (10.000 células por cavidade) e tratadas por 72 horas com a fucana B na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ao final do tratamento, para evitar interferência no ensaio devido à proliferação de células, foi adicionado e mantido em cultura por uma hora 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mitomicina C (#M0503, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, o meio foi descartado e foi adicionado meio novo. A seguir, foi realizado um risco em cada cavidade da placa, com o auxílio de uma ponteira de 10 μL , removendo células. A placa foi novamente lavada com meio de cultura para a retirada de células soltas e então foi adicionado meio de cultura para a documentação em microscopia de contraste de Interferência Diferencial (DIC), em microscópio confocal modelo NIKON A1R+SiMP (Nikon Instrument, Tóquio, Japão). A placa permaneceu em sistema com temperatura (37°C) constante. Foram obtidas imagens em intervalos de 30 minutos, durante 16 horas. A área de preenchimento das células tratadas, em comparação ao grupo controle, foram analisadas com o uso do software NIS-Elements AR Analysis. Foram realizados dois experimentos independentes, em duplicata.

4.7 EXPRESSÃO GÊNICA: RTq-PCR

O RNA total foi isolado de células da linhagem B16-F10 expostas ou não ao tratamento com o polissacarídeo sulfatado fucana B (100µg/ml) por 72 horas e transferidas para uma superfície sensibilizada com matrigel®, na qual foram mantidas por 48h. A extração de RNA foi realizada com o kit de extração E.Z.N.A.TM Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA obtido foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo, Waltham, MA USA). A transcrição reversa foi feita com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando 500 ng do RNA total e hexâmetros randômicos como *primers*. As expressões dos genes de interesse foram quantificadas no StepOne Plus da Applied Biosystems, utilizando o Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante, utilizando primers específicos para os genes de interesse (*MMP2*, *MMP9*, *MMP14*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *RECK*) em um volume final de reação de 12 µL. A expressão gênica determinada foi normalizada pela média geométrica da expressão relativa dos genes de referência *PPIA*, *PGK1* e *HPRT* (VANDESOMPELE et al., 2002). Os valores de expressão obtidos foram expressos como $\log_2 \left(\frac{\text{expressão no tratamento}}{\text{expressão no controle}} \right)$. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise dos dados obtidos nas amostras biológicas durante os ensaios laboratoriais foram realizadas por meio do software GraphPad PRISM 6.0, com o uso de testes não paramétricos, para verificar a presença ou não de significância estatística ($p \leq 0,05$ ou $p > 0,05$), comparando cada amostra com o seu controle negativo específico (não tratado).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

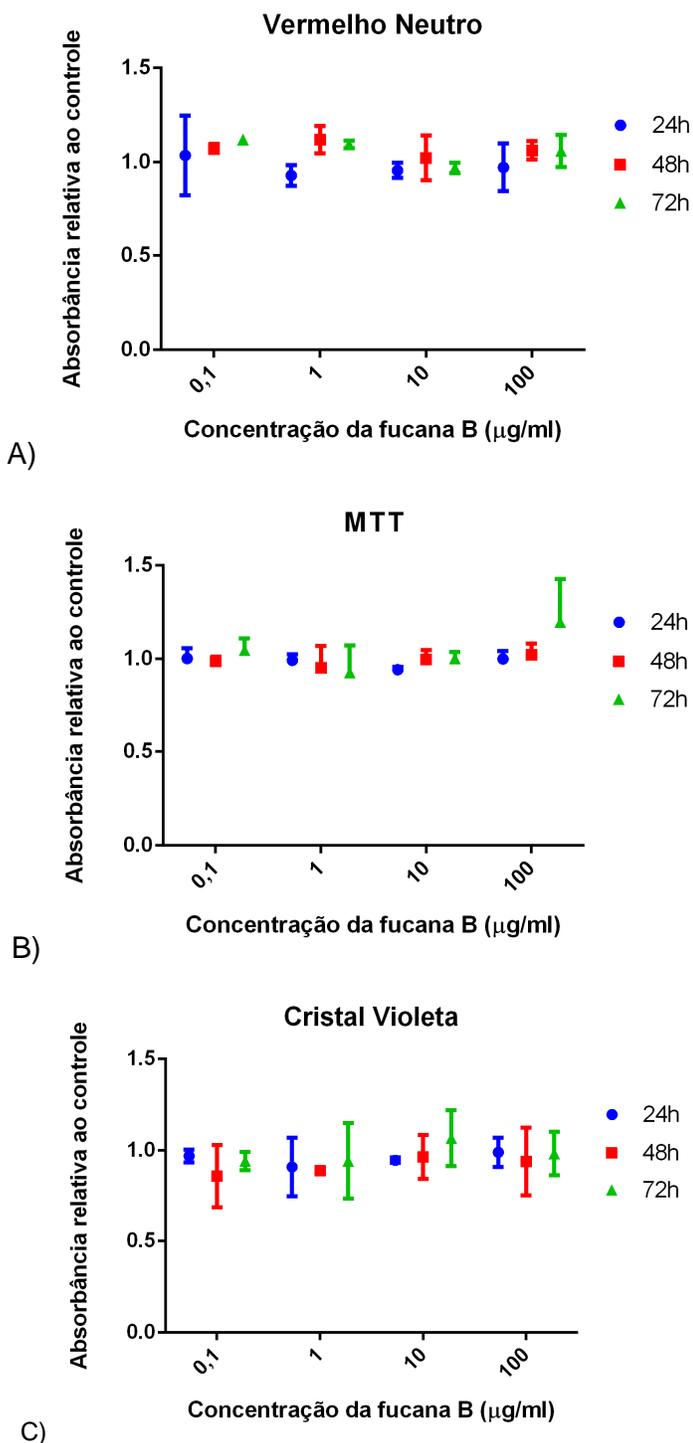
5.1 VIABILIDADE, CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

O tratamento das células B16F10 com a fucana B nas quatro concentrações testadas (0,1, 1, 10 e 100 µg/ml), nos tempos de 24, 48 e 72h, não alterou os parâmetros avaliados nos ensaios de proliferação (cristal violeta), citotoxicidade (MTT) e viabilidade celular (vermelho neutro) (GRÁFICO 1), indicando que a fucana B, nestas concentrações, não é citotóxica e não compromete os parâmetros avaliados de normalidade das células, tanto em baixa, quanto em alta densidade, sendo possível utilizar o composto para estudos bioquímicos posteriores *in vitro*.

A manutenção da atividade lisossomal das células, observada no ensaio de viabilidade celular (vermelho neutro), bem como a ausência de citotoxicidade, avaliada pela atividade de desidrogenases celulares (ensaio de MTT), são desejáveis, a fim de que, em caso de uso farmacológico ou quimioterápico, os efeitos deletérios do tratamento e seus efeitos colaterais sejam os menores possíveis. Já uma redução da proliferação celular seria um resultado desejável, ainda que não fundamental para uma potencial ação antitumoral.

É incomum na literatura científica a busca por compostos antitumorais sem ação citotóxica, sendo justamente a citotoxicidade o mecanismo de ação mais comum dos quimioterápicos antineoplásicos empregados regularmente. No entanto, esta ação não seletiva contra células tumorais leva a efeitos colaterais indesejados, em decorrência da ação citotóxica em células não tumorais. Nesse contexto, biomoléculas como polissacarídeos podem apresentar-se como uma alternativa na busca de compostos antitumorais sem ação citotóxica e, portanto, causadores de menos efeitos colaterais. Alguns estudos indicam a existência de polissacarídeos não citotóxicos com efeito antitumoral (ABU et al., 2015; MENG; LIANG; LUO, 2016; TONG et al., 2009; BISCAIA, 2016), abrindo a possibilidade de explorar a ação destas biomoléculas, incluindo-se a fucana B, como agentes antineoplásicos.

GRÁFICO 1 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE FUNCIONALIDADES CELULARES



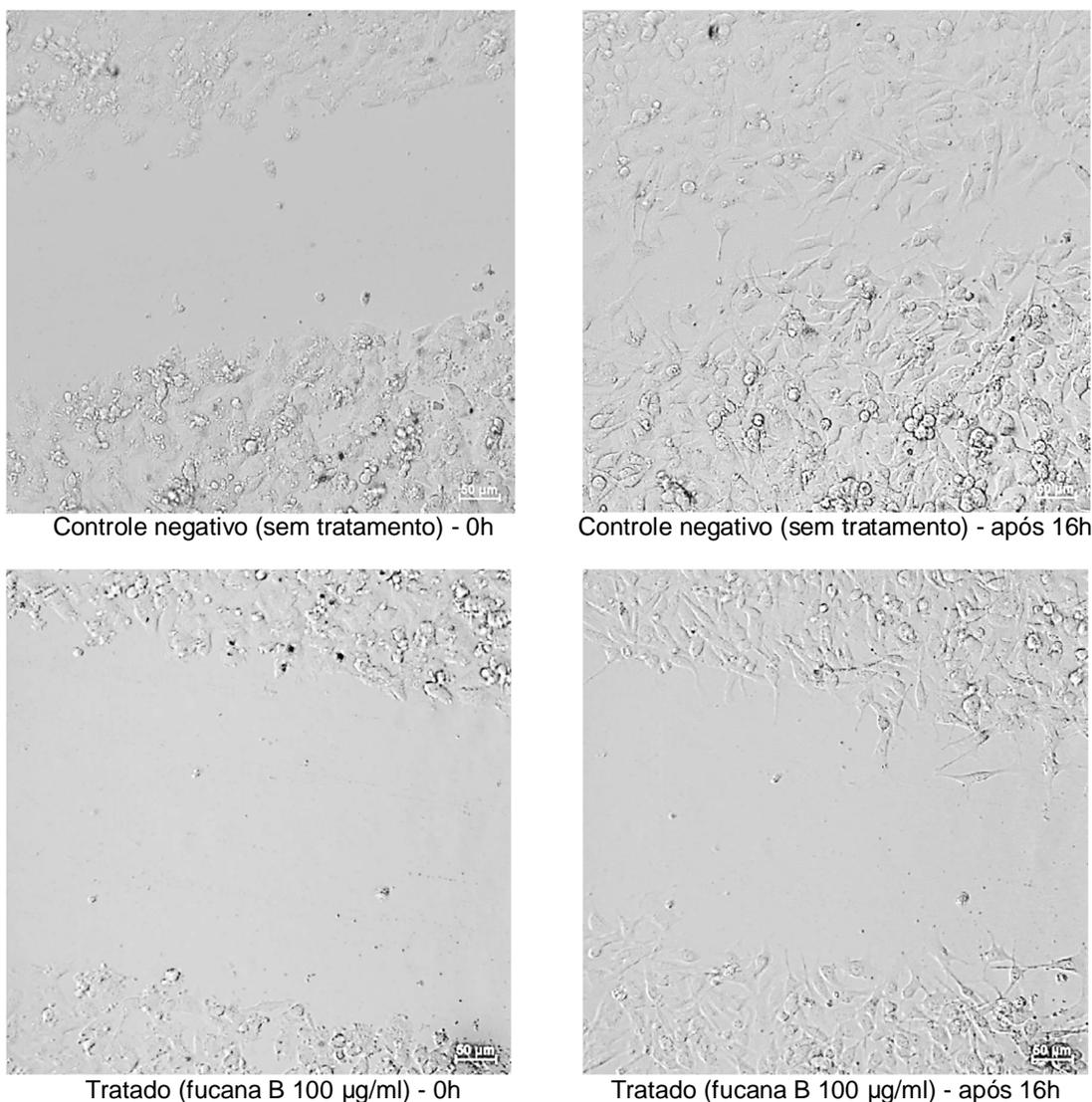
FONTE: A autora (2016).

LEGENDA: Médias (com desvio padrão) das absorbâncias das células B16F10 tratadas com a fucana B, em diferentes concentrações comparadas ao grupo controle (sem tratamento), em três tempos (24, 48 e 72 h). A) Viabilidade. B) Citotoxicidade. C) Proliferação. A análise estatística utilizando teste não paramétrico (Kruskal-Wallis) aponta que não há diferença significativa entre as médias do grupo controle e dos grupos tratados ($p > 0,05$).

5.2 MIGRAÇÃO CELULAR

As células B16F10 tratadas com a fucana B na concentração de 100 µg/ml durante 72h apresentaram um comportamento de migração celular alterado, diminuído, quando comparado ao grupo controle (não tratado) (FIGURA 10), de acordo com a metodologia utilizada para o ensaio de *scratch* (descrita no item 4.6).

FIGURA 10 - RESULTADOS DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO COM AS CÉLULAS B16F10



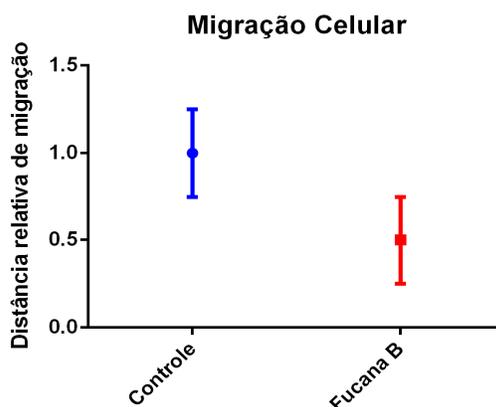
FONTE: A autora (2016).

LEGENDA: Imagens representativas do ensaio de migração celular. As imagens à esquerda foram tiradas imediatamente após a remoção das células da região linear central. As imagens à direita, após 16h. As células do grupo tratado com a fucana B (100 µg/ml) reocuparam uma área proporcionalmente menor, quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento), mas sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$).

NOTA: O ensaio completo com todas as imagens está disponível no APÊNDICE 1.

Após 16h de coleta de imagens, foi possível verificar que a reocupação da área da placa onde as células foram removidas foi menor nos grupos de células B16F10 tratadas previamente com o polissacarídeo sulfatado fucana B, na concentração de 100 µg/ml, durante 72h, do que no grupo controle (células não tratadas). A diferença média de reocupação de área entre os grupos tratado e não tratado foi de cerca de 48 % (GRÁFICO 2). No entanto, aplicando-se o teste estatístico não paramétrico de Mann Whitney sobre os dados, devido ao pequeno número de amostras, a diferença entre os dois grupos não foi significativa ($p > 0,05$), o que indica a necessidade de mais repetições para validar os resultados.

GRÁFICO 2 – RESULTADO DOS ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CELULAR



FONTE: A autora (2016).

LEGENDA: Resultado do ensaio de migração das células B16F10, mostrando que o grupo tratado com a fucana B (100 µg/ml) por 72h recuperou uma área proporcionalmente menor, quando comparado ao grupo controle (sem tratamento), mas sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$).

5.3 EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

No melanoma, durante o crescimento horizontal e vertical do tumor, da epiderme para a derme e para vasos linfáticos ou endoteliais, as células adquirem a capacidade de migrar para invadir os tecidos e, posteriormente, outros órgãos, caracterizando a metástase. Os fatores e mecanismos que direcionam o processo migratório são diversos e incluem, entre outras moléculas, a participação de metaloproteinases e seus inibidores (BONAVENTURE; DOMINGUES; LARUE, 2013).

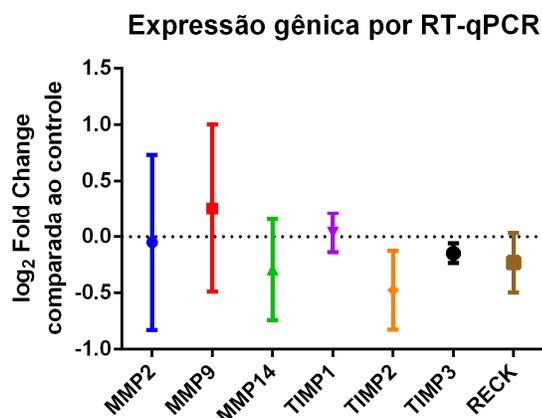
A partir do resultado do ensaio de migração celular, indicando que o polissacarídeo sulfatado fucana B, na concentração testada, pode ter ação sobre essa dinâmica celular, diminuindo-a, foi realizado um ensaio para investigar a expressão

gênica de moléculas características do perfil metastático do melanoma, sendo as selecionadas para a análise: *MMP2*, *MMP9*, *MMP14*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *RECK*.

No entanto, quando comparadas às células não tratadas com a fucana B, as células da linhagem B16F10 tratadas por 72h com o composto na concentração de 100 µg/ml não apresentaram alteração na expressão gênica de nenhum dos alvos avaliados, de acordo com a metodologia escolhida (item 4.7 deste trabalho) (GRÁFICO 2).

Sabe-se que a migração das células através da membrana basal promove a liberação de MMP2 e MMP9 (BONAVENTURE; DOMINGUES e LARUE, 2013), sendo esperado um aumento da expressão destas proteínas durante o desenvolvimento tumoral, no entanto, as células do grupo controle expressaram uma quantidade muito pequena destas moléculas, inviabilizando uma análise quantitativa confiável comparada ao grupo tratado.

GRÁFICO 2 – EFEITO DA FUCANA B NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MMPs E SEUS INIBIDORES



FONTE: A autora (2016).

LEGENDA: Resultado da análise de expressão gênica por RT-qPCR não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e células B16F10 tratadas com a fucana B ($p > 0,05$).

A ausência de diferença na expressão gênica destas moléculas entre o grupo tratado e o controle não significa, necessariamente, que a fucana B, na concentração escolhida, não possui efeito sobre as células tumorais. Uma vez que foi observada a diminuição da migração das células *in vitro*, seria interessante buscar outros alvos para uma nova análise de expressão gênica, como proteoglicanos (sindecans) e outras moléculas de adesão celulares (integrinas), por exemplo.

6 CONCLUSÃO

O polissacarídeo sulfatado fucana B não alterou *in vitro* os parâmetros de proliferação, citotoxicidade e viabilidade de células B16F10 nas concentrações testadas, no entanto, foi capaz de reduzir a migração celular. Este último resultado, apesar de promissor, demanda mais repetições para validação estatística. Além disso, a fucana B não alterou a expressão gênica das metaloproteinases *MMP2*, *MMP9* e *MMP14* e seus inibidores *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *RECK* nas condições testadas.

A fim de complementar estes resultados iniciais, devem ser realizados estudos para avaliar os efeitos da fucana B na dinâmica de invasão celular, a fim de confirmar um potencial antitumoral do composto e direcionar estudos pré-clínicos posteriores. Além disso, também devem ser analisados os efeitos da fucana B na expressão gênica de outras moléculas-chave para o perfil metastático do melanoma, tais como sindecans e integrinas.

REFERÊNCIAS

- ABU, R. et al. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 4, p. 727-732, 2015.
- BARROSO, E. M. A.; COSTA, L. S.; MEDEIROS, V. P.; et al. A non-anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity in vivo. **Planta Medica**, v. 74, n. 7, p. 712-718 2008.
- BERTEAU O, MULLOY B. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 29-40, 2003.
- BISHOP, J. R.; SCHUKSZ, M.; ESKO, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1030-1037, 2007.
- BONAVENTURE, J; DOMINGUES, MJ.; LARUE, L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 26, n. 3, p. 316-325, 2013.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v. 24, n. 23, p. 119-124, 1985.
- BOSSERHOFF, A. K. **Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application**. New York: Springer Science & Business Media, 2011.
- BRANDNER, J. M.; HAASS, N. K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology**, v. 45, n. 5, p. 443-452, 2013.
- CHANG, C.; HUNG, W.; CHANG, H. The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and *in vivo*. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6, p. 2781-2789, 2008.
- CLARCK, J.; THOMAS, D. RECK- a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 26, p. 675-683, 2007.
- DAMSKY, W. E.; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncogene**, v. 33, n. 19, p. 2413-22, 2014.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.
- ENGELBERG, H. Actions of heparin that may affect the malignant process. **Cancer**, v. 85, n. 2, p. 257-272, 1999.
- FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453-458, 2003.
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007.
- GÜNTHERT, U.; HOFMANN, M.; RUDY, W.; et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. **Cell**, v. 65, n. 1, p. 13-24, 1991.
- HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, n. 2, p. 153-163, 2005.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 18, n. 3, p. 150-159, 2005.

HOFMANN, U. B.; EGGERT, A. A. O.; BLASS, K.; BRÖCKER, E. B.; BECKER, J. C. Expression of Matrix Metalloproteinases in the Microenvironment of Spontaneous and Experimental Melanoma Metastases Reflects the Requirements for Tumor Formation. **Cancer Research**, v. 63, n. 23, p. 8221-8225, 2003.

HOFMANN, U. B.; HOUBEN, R.; BRÖCKER, E. B.; BECKER, J. C. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Biochimie**, v. 87, n. 34, p. 307-314, 2005.

VAN DEN HURK, K.; NIESSEN, H. E. C.; VEECK, J.; et al. Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: A concert out of tune. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 1, p. 89-102, 2012.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=1>>. Acesso em: 22/6/2016.

ITAGAKI, H.; HAGINO, S.; KATO, S.; KOBAYASHI, T.; UMEDA, M. An in vitro alternative to the Draize eye-irritation test: Evaluation of the crystal violet staining method. **Toxicology in Vitro**, v. 5, n. 2, p. 139-143, 1991.

JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P.W. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. **Physiol Review**, v. 91, n. 1, p. 221-264, 2011.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196-233, 2011.

JIMBOW, K.; QUEVEDO, W. C.; FITZPATRICK, T. B.; SZABO, G. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. **The Journal of investigative dermatology**, v. 67, n. 1, p. 72-89, 1976.

KRAUTHAMMER, M.; KONG, Y.; BACCHIOCCHI, A.; et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. **Nature Genetics**, v. 47, n. July, p. 1-9, 2015.

KUNZ, M. MicroRNAs in melanoma biology. **Advances in experimental medicine and biology**, v.774, p. 103-120, 2013.

KUNZ, M. Oncogenes in melanoma: An update. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 12, p. 1-10, 2014.

KURCHAT, P.; WICKENHAUSER, C.; GROTH, W.; KRIEG, T.; MAUCH, C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. **Journal of Pathology**, v. 197, n. 2, p. 179-187, 2002.

LAMBERT, E., DASSÉ, E.; HAYE, B., PETITFRERE, E. TIMPs as multifacial proteins. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, n. 3, p. 187-198, 2004.

LECUMBERRI, R.; PÁRAMO, J. A.; ROCHA, E. Anticoagulant treatment and survival in cancer patients. The evidence from clinical studies. **Haematologica**, v. 90, n. 9, p. 1258-1266, 2005.

LEITINGER, B. Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 310, p. 39-87, 2014.

LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

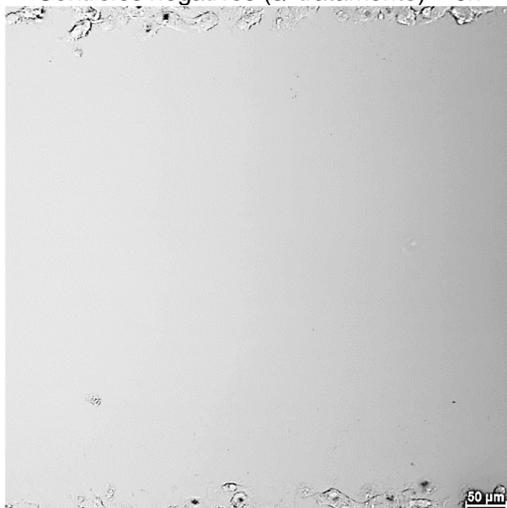
LO, J. A.; FISHER, D. E. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6212, p. 945-949, 2014.

- MENG, X.; LIANG, H.; LUO, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydrate Research**, v. 424, p. 30-41, 2016.
- MORO, N.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. Metalloproteinases in melanoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 1, p. 23-29, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 12, p. 55-63, 1983.
- MOURÃO, P. A.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 9, n. 8, p. 225-32, 1999.
- MULTHAUPT, H. A. B.; LEITINGER, B.; GULLBERG, D.; COUCHMAN, J. R. Extracellular matrix component signaling in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 28-40, 2016.
- NIKITOVIC, D.; MYTILINAIIOU, M.; BERDIAKI, A.; KARAMANOS, N. K.; TZANAKAKIS, G. N. Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 8, p. 2471-2481, 2014.
- NOBRE, L. T. D. B.; VIDAL, A. A. J.; ALMEIDA-LIMA, J.; et al. Fucan effect on CHO cell proliferation and migration. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 224-232, 2013.
- PALUNCIC, J.; KOVACEVIC, Z.; JANSSON, P. J.; et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1863, n. 4, p. 770-784, 2016.
- PATEL, S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. **3 Biotech**, v. 2, p. 171-185, 2012.
- PEREIRA, M. S.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? **Glycobiology**, v. 12, n. 10, p. 573-580, 2002.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, n. 12, p.1016-1027, 2008.
- ROCHA, H. A. O.; COSTA, L. S.; LEITE, E. L. Structural and Biological Insights into Antitumor Seaweed Sulfated Polysaccharides. In: V. H. Pomin (Org.). **Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal**. 1. ed. New York: Nova Science Publishers, 2011. p. 221-232.
- ROCHA, H. A. DE O.; BEZERRA, L. C. L. DE M.; DE ALBUQUERQUE, I. R. L.; et al. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. **Planta medica**, v. 71, n. 4, p. 379-81, 2005b.
- ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; et al. Fucan inhibits Chinese hamster ovary cell (CHO) adhesion to fibronectin by binding to the extracellular matrix. **Planta Medica**, v. 71, n. 7, p. 628-633, 2005c.
- ROCHA, H. A. O.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; et al. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*: An ideal antithrombotic agent? **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41278-41288, 2005a.
- SAITO, R. D. F.; TORTELLI, T. C.; JACOMASSI, M. D. A.; OTAKE, A. H.; CHAMMAS, R. Emerging targets for combination therapy in melanomas. **FEBS Letters**, v. 589, n. 22, 2015.

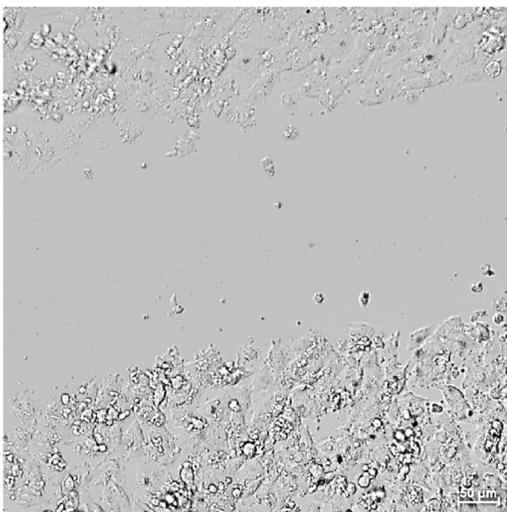
- SANTI, F. C. **Avaliação das alterações moleculares causadas por polissacarídeos sulfatados em modelo de melanoma in vitro**. 98f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicology in Vitro**, v. 3, n. 4, p. 317-321, 1989.
- SCHLESINGER, M.; SCHMITZ, P.; ZEISIG, R.; et al. The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 5, p. 603-610, 2012.
- SEFTOR, R. E. B.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M. J. C. Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, 1999.
- SENNI, K.; PEREIRA, J.; GUENICHE, F.; et al. Marine Polysaccharides: A Source of Bioactive Molecules for Cell Therapy and Tissue Engineering. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 1664-1681, 2011.
- SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature reviews. Cancer**, 2016.
- BISCAIA, S. M. P. **Manogalactana parcialmente metilada de *Pleurotus eryngii* possui atividade antimelanoma sem efeito colateral**. 2016. 146 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; KARAMANOS, N. K. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4-27, 2016.
- TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L.; JIANG, R.; TIAN, D.; SUN, X. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1682-1686, 2009.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.
- VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Melanoma and the tumor microenvironment. **Current Oncology Reports**, v. 10, n. 5, p. 439-446, 2008.
- WANG, L.; WANG, X.; WU, H.; LIU, R. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. **Marine Drugs**, v. 12, n. 9, p. 4984-5020, 2014.
- WHO. **Skin cancers**. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>>. Acesso em: 22/6/2016.
- WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14-21, 2011.
- WU, X. Z.; CHEN, D. Effects of sulfated polysaccharides on tumour biology. **West Indian Medical Journal**, v. 55, n. 4, p. 270-273, 2006.

APÊNDICE 1 – ENSAIO DE MIGRAÇÃO COMPLETO

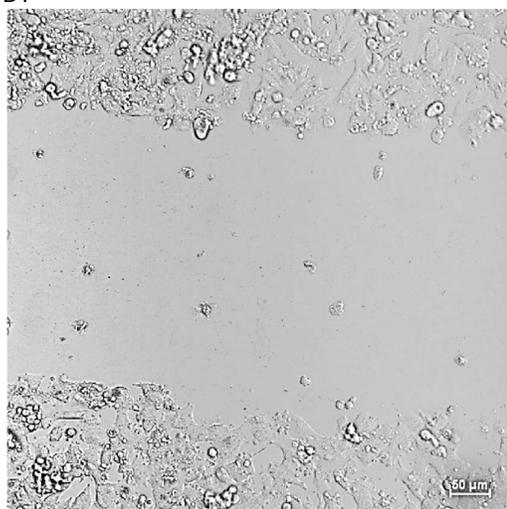
Controles negativos (s/ tratamento) – 0h



A1

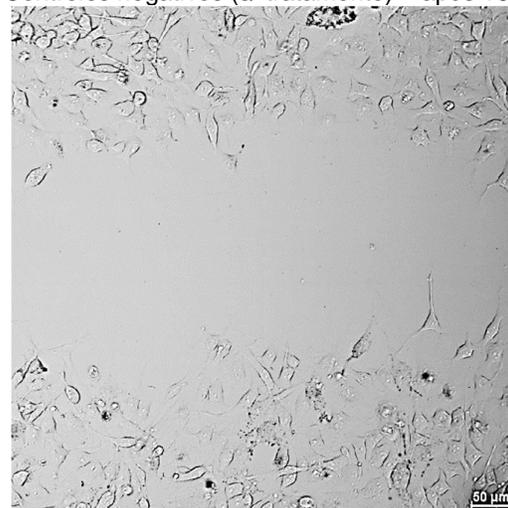


B1

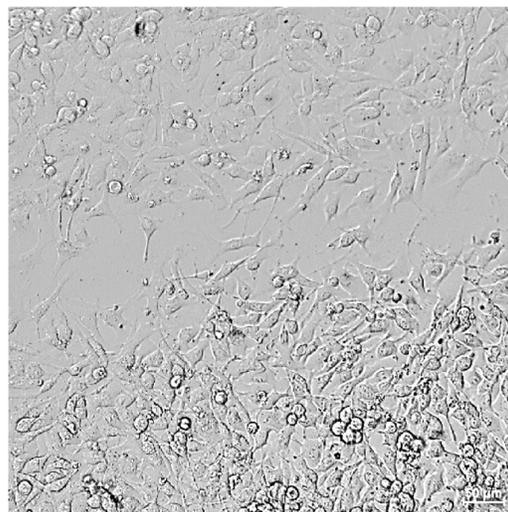


C1

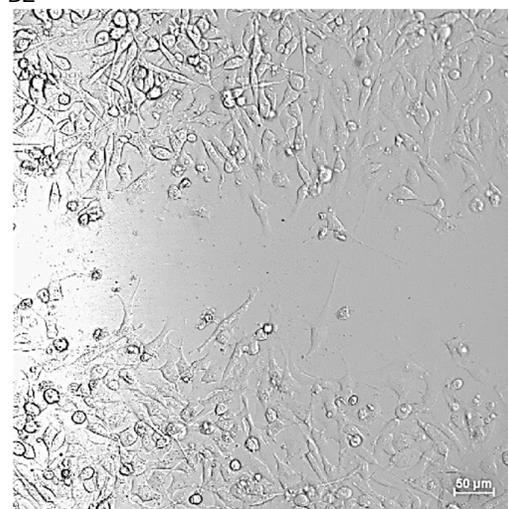
Controles negativos (s/ tratamento) – após 16h



A2

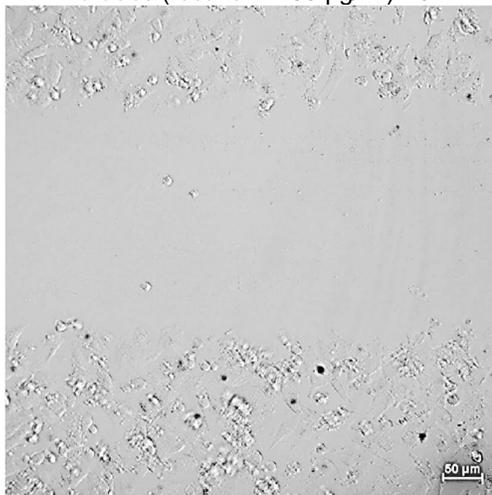


B2

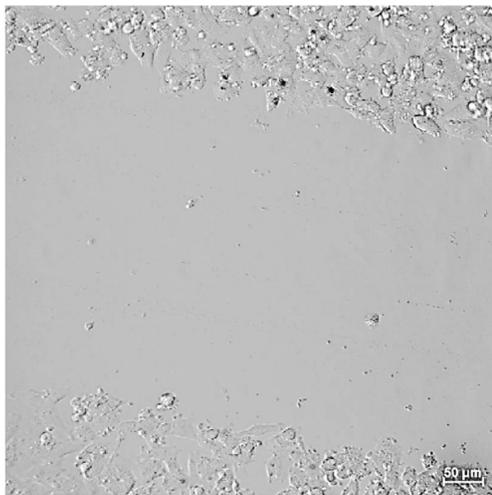


C2

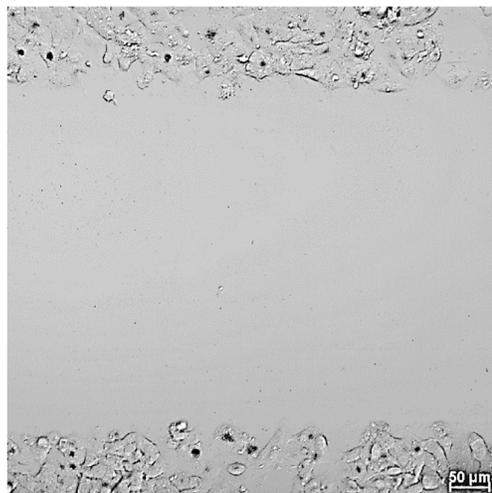
Tratados (fucana B 100 µg/ml) - 0h



a1

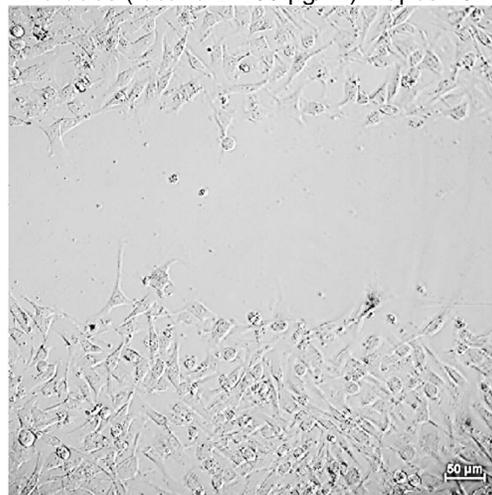


b1

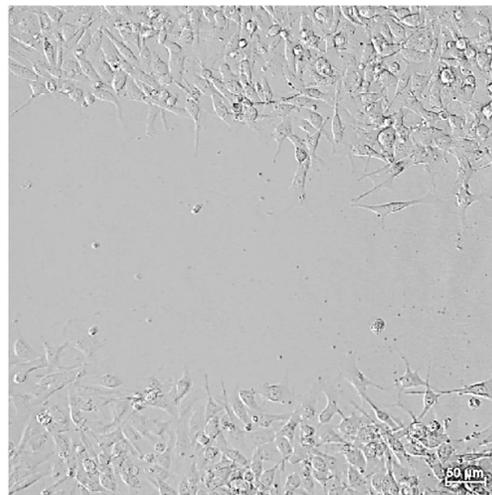


c1

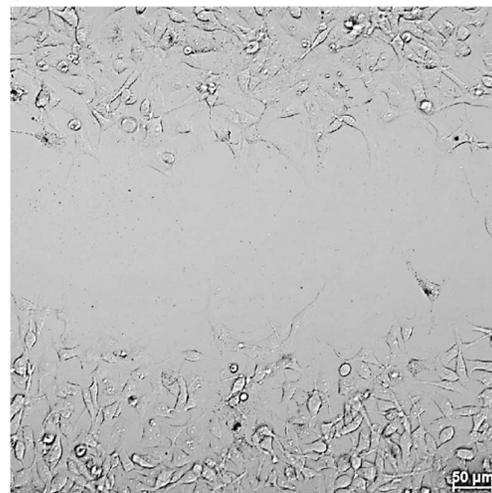
Tratados (fucana B 100 µg/ml) – após 16h



a2



b2



c2

Observação: Um dos grupos controle e um dos grupos tratados foram omitidos dos resultados porque o risco central ficou espesso demais, ultrapassando os limites da imagem, não sendo, portanto, possível uma quantificação confiável.