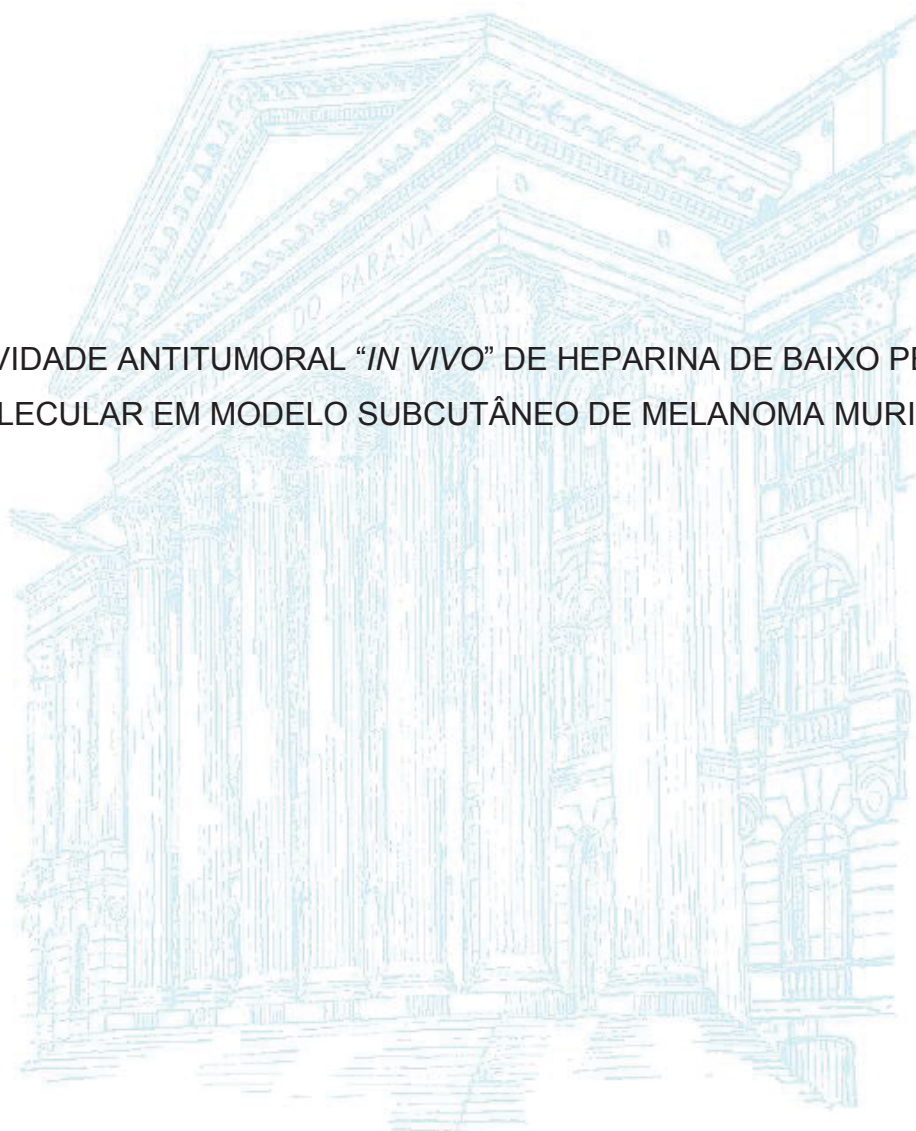


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLEBER RAFAEL VIEIRA DA COSTA

ATIVIDADE ANTITUMORAL “*IN VIVO*” DE HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR EM MODELO SUBCUTÂNEO DE MELANOMA MURINO.



CURITIBA

2014

CLEBER RAFAEL VIEIRA DA COSTA

ATIVIDADE ANTITUMORAL “*IN VIVO*” DE HEPARINA DE BAIXO PESO
MOLECULAR EM MODELO SUBCUTÂNEO DE MELANOMA MURINO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Costa, Cleber Rafael Vieira da
Atividade antitumoral "*in vivo*" de heparina de baixo peso molecular em modelo subcutâneo de melanoma murino. / Cleber Rafael Vieira da Costa.
– Curitiba, 2014.
87 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Melanoma. 2. Ácido Hialurônico. 3. Heparina. I. Título. II. Trindade, Edvaldo da Silva. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.


CDD (20. ed.) 616.99477

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRGN


Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Suplente:

Prof. Dr. Marco Antonio Ferreira Randi
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o mestrando **Cleber Rafael Vieira da Costa**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Atividade antitumoral *in vivo*" de heparina de baixo peso molecular em modelo subcutâneo de melanoma murino", são de parecer favorável à ^{Aprovado}..... do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Outubro de 2014





Aos meus amigos pelo apoio incondicional.

À minha família por todo esforço,

na construção de quem eu sou.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Professor Doutor Edvaldo da Silva Trindade, pela orientação, confiança, apoio e paciência para me auxiliar no desenvolvimento do trabalho.

Às Professoras Dorly Freitas Buchi, Carolina Camargo Oliveira e Célia Regina Cavichiolo Franco, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do laboratório Citopar, Maria Fernanda Sanches Soares, Ana Paula Percicote, Antonio de Pádua Gomes da Silva, Larissa Luvison Gomes da Silva pela disposição do espaço para desenvolvimento de alguns experimentos, bem como o apoio para tal.

Aos amigos do LIPS e LCIN, Lucas Ferrari Andrade, Katia Fialho, Flávia Santi, Stellee Biscaia, Gustavo Rossi, Jenifer Pendiuk Gonçalves, Divino Martins Oliveira, Daniela Leme, Daniel Belan e Diego Del Pino, pela amizade companheirismo e pelo apoio no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular, pela ajuda na execução do trabalho.

À minha família, por ter me suportado nestes dois anos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e destaca-se por possuir alta capacidade metastática, representando um significativo e crescente problema na saúde pública mundial. Em estágio avançado, o prognóstico dos pacientes é frequentemente de sobrevida de 6-9 meses, sendo a sobrevida de cinco anos menor do que 10% dos casos. Além disto, este câncer é pouco responsivo aos tratamentos convencionais (quimioterapia ou radioterapia), e vale salientar que provocam vários efeitos colaterais, reduzindo a qualidade de vida do paciente. Assim, uma estratégia interessante para o combate ao melanoma é a utilização de compostos que causam diminuição da atividade metastática e invasiva desse tipo de tumor, mas com mínimos efeitos colaterais. Neste sentido, destacam-se os agentes antitrombóticos, em especial a heparina e sua forma despolimerizada (heparina de baixo peso molecular - LMWH). Dentre outras aplicações clínicas, esses compostos são utilizados para evitar a formação de trombos em pacientes acometidos por tumores que desenvolvem síndrome de Trousseau, no entanto, foi observado sobrevida destes pacientes, o que fundamenta pesquisas com esses fármacos, como possíveis agentes antitumorais. Diversos trabalhos comprovam o efeito antitumoral de LMWH, inclusive em melanoma, com estudos *in vitro* e *in vivo*. No entanto, não é conhecido o mecanismo de ação. Assim, considerando a baixa eficiência dos tratamentos convencionais para o melanoma, o presente trabalho visa estudar a ação dos polissacarídeos sulfatados, em especial de heparina e LMWH, sobre modelos de melanoma murino *in vivo* e investigar seu mecanismo de ação. Os resultados mostraram que LMWH possui menos efeito colateral que heparina não fracionada, sendo, portanto, o fármaco escolhido. Duas doses foram testadas, e 5 mg/Kg foi mais eficiente que 1 mg/Kg, sendo a dose eleita. Os resultados são muito promissores, pois não revelaram efeitos colaterais e mostraram uma redução no desenvolvimento tumoral da ordem de 70%. Avaliações histológicas e imunohistoquímica revelaram que há uma menor formação de vasos, o que poderia ser responsável pelo aumento da taxa de apoptose e diminuição da proliferação celular. Outras moléculas-chaves foram avaliadas e revelou uma menor quantidade de MMPs (2, 9 e 14), bem como uma diminuição na quantidade de carboidratos e glicoconjugados importantes, como ácido hialurônico e seu receptor CD44 e de Proteoglicano de Condroitim Sulfato, marcador importante para melanoma. O Heparan Sulfato também foi avaliado e mostrou ter maior quantidade no grupo tratado o que pode ser explicado pela diminuição da quantidade de enzimas que o degradam (as heparanases). Já os Proteoglicanos de Heparan Sulfato que estão superexpressos no melanoma, todos mostraram uma grande redução. Os dados até o momento mostram claramente que LMWH reduz o desenvolvimento do tumor, o que pode ser explicado pela menor formação de vasos e redução de moléculas importantes para o padrão que confere a agressividade ao melanoma.

Palavras-chave: Melanoma. LMWH. Ácido Hialurônico. MMPs.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and is characterized by having high metastatic capacity, representing a significant and growing public health problem worldwide. In advanced stages, the prognosis is often survival of 6-9 months, with the five-year survival less than 10% of cases. Moreover, this is responsive to conventional cancer treatments (chemotherapy or radiotherapy) which cause various side effects, reducing the quality of life of the patient. Thus, an interesting strategy to combat melanoma is the use of compounds that cause decreased invasive and metastatic activity of this type of tumor, but with minimal or no side effects. In this regard, it is noteworthy antithrombotic agent, in particular heparin and low molecular weight heparin (LMWH) obtained by chemical or enzymatic fragmentation of unfractionated heparin. This molecule is used to prevent thrombus formation in patients affected by tumors that develop Trousseau syndrome, but survival was found that these made use of LMWH. Several studies have confirmed the antitumor effect of LMWH, including melanoma, with studies *in vitro* and *in vivo*. However, it is not known the mechanism of action. Thus, considering the low efficiency of conventional treatments for melanoma, the present work aims to study the action of sulfated polysaccharides, particularly heparin and LMWH, on models of murine melanoma *in vivo* and investigate its mechanism of action. The results showed that LMWH has fewer side effects than unfractionated heparin, the drug is therefore chosen. Two doses were tested, and 5 mg / kg was superior to 1 mg / kg, and the dose chosen. The results are promising since it showed no side effects and showed a reduction in tumor development of about 70%. Histological and immunohistochemical evaluations revealed that there is a smaller vessel formation, which could be responsible for the increased rate of apoptosis and decreased cell proliferation. Other key molecules were examined and showed a smaller amount of MMPs (2, 9, 14) as well as a decrease in the amount of carbohydrates and glycoconjugates important as hyaluronic acid and its CD44 receptor and proteoglycan chondroitin sulfate, important marker for melanoma. The heparan sulfate proteoglycans that are overexpressed in melanoma, all showed a great decrease in the treated group, which can be explained by the reduced amount of enzymes which degrade (as metalloproteinases). The data clearly show that LMWH reduces tumor development, which may be explained by the lower vessel formation and reduction important molecules for the standard which confers aggressive melanoma.

Key-words: Melanoma. LMWH. Hyaluronic acid. MMPs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. O MELANOMA MALIGNO	13
FIGURA 2. OS SEIS NÍVEIS DE CLARK (I - IV).....	15
FIGURA 3. CLASSIFICAÇÃO ATUALIZADA DOS ESTÁGIOS DO MELANOMA	16
FIGURA 4. VIA DE SINALIZAÇÃO DO MELANOMA.....	18
FIGURA 5. INTERAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO COM SEUS RECEPTOR PRESENTES NO MELANOMA.....	24
FIGURA 6. UNIDADE ESTRUTURAL DOS GLICOSAMINOGLICANOS	28
FIGURA 7. UNIDADE HEXASSACARÍDICA BÁSICA DA HEPARINA	35
FIGURA 8. ESQUEMA DA AÇÃO DA HEPARINA SOBRE AS CÉLULAS TUMORAIS	38
FIGURA 9. PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DAS MARCAÇÕES OBTIDAS	43
FIGURA 10. LMWH LEVA A DIMINUIÇÃO DO TAMANHO DO TUMOR	45
FIGURA 11. LMWH 5 MG/KG E LMWH 1MG/KG LEVAM A REDUÇÃO DO VOLUME TUMORAL.....	46
FIGURA 12. ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TUMORES SÓLIDOS.....	47
FIGURA 13. LMWH REDUZ A QUANTIDADE DE MELANINA EM MELANOMA MURINO.....	48
FIGURA 14. LMWH REDUZ A QUANTIDADE DE MELANINA EM MELANOMA MURINO.....	49
FIGURA 15. TRATAMENTO POR LMWH LEVA A REDUÇÃO NA PROLIFERAÇÃO DE B16-F10.....	50
FIGURA 16. LMWH AUMENTA A EXPRESSÃO DE CASPASE-3 EM MELANOMA..	51
FIGURA 17. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE VEGF EM MELANOMA MURINO...	52
FIGURA 18. LMWH 5MG/KG LEVA A REDUÇÃO NA PROLIFERAÇÃO, EXPRESSÃO DE VEGF E AUMENTA A MORTE CELULAR.....	53
FIGURA 19. LMWH REDUZ A QUANTIDADE DE CARBOIDRATOS TOTAIS EM MELANOMA.....	54
FIGURA 20. LMWH LEVA A REDUÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁCIDO HILURÔNICO	55

FIGURA 21. A EXPRESSÃO DE CD44 NÃO É ALTERADA PELO TRATAMENTO COM LMWH.....	56
FIGURA 22. PROTEOGLICANO DE CONDROTIM SULFATO É REDUZIDO PELO TRATAMENTO COM LMWH	57
FIGURA 23. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS, ÁCIDO HIALURÔNICO E PGCS	58
FIGURA 24. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE SINDECAM-1	59
FIGURA 25. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE SINDECAM-2	60
FIGURA 26. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE SINDECAM-4	61
FIGURA 27. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE GLPICAM-1 EM MELANOMA.....	62
FIGURA 28. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE PGHS	63
FIGURA 29. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE MMP2 EM MELANOMA MURINO ..	64
FIGURA 30. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE MMP9 EM MELANOMA	65
FIGURA 31. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE MT1-MMP EM MELANOMA	66
FIGURA 32. LMWH AUMENTA A EXPRESSÃO DE RECK EM MELANOMA MURINO.....	67
FIGURA 33. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES, E AUMENTA A EXPRESSÃO DE RECK	68
FIGURA 34. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE TCTP EM MELANOMA	69
FIGURA 35. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO TCTP	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AH - Ácido hialurônico
cAMP - adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
CAM – Moléculas de adesão celular
CDKN2A – Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CDK4 – Quinase dependente de ciclina 4
CS – Controitim sulfato
CTL4 - Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DS – Dermatam sulfato
EGFR- Fator de crescimento epidermal
EPC – Células progenitoras endoteliais
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto
GAGs – Glicosaminoglicanos
GPI – Glicosil fosfatidil inositol
HE – Hematoxilina e eosina
HS – Heparan sulfato
IL-2 – Interleucina 2
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
INCA – Instituto Nacional do Câncer
LMWH – Heparina de Baixo Peso Molecular (Low Molecular Weight Heparin)
MC1-R – Receptor de melanocortina-1
MEC – Matriz extracelular
MITF – Fator tumoral de microftalmia
MMPs – Metaloproteases
MMP-2 – Metaloprotease-2
MMP-9 – Metaloprotease-9
mRNA – RNA mensageiro
MSC - Células tronco mesenquimais
MSH – Hormônio melanócito estimulante
MT1-MMP – Metaloprotease transmembrânica 1
NG2- Antígeno nervo-glial 2

NK – Células natural killer
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAS - Ácido periódico-Schiff
PGCS – Proteoglicano de Condroitim sulfato
PGHS – Proteoglicano de heparam sulfato
PGs – Proteoglicanos
POMC – Pró-opiomelanocortina
PTEN – Proteína homóloga a tensina fosfatase
RGP- Fase de crescimento radial
RHAMN - receptor de motilidade mediado por hialuronam
RNA – Ácido Ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
TCTP - Translationally controlled tumour protein
TF – Fator tecidual
TGF – Fator de crescimento transformante
TIMPs – Inibidor tecidual de metaloproteases
TNF – Fator de necrose tumoral
UV – Ultravioleta
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR – Receptor de fator de crescimento endotelial vascular
VGP – Fase de crescimento vertical

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. MELANOMA	13
1.2. TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DOS MELANÓCITOS	16
1.3. CRESCIMENTO TUMORAL E ANGIOGÊNESE	20
1.4. METÁSTASE	22
1.5. MODELOS BIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO TUMORAL E METÁSTASE EXPERIMENTAL	25
1.6. TRATAMENTOS CLÍNICOS DE MELANOMA	26
1.7. POLISSACARÍDEOS	27
1.7.1 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos sulfatados e não sulfatados.....	27
1.7.2. Heparina e atividade antitumoral.....	34
1.7.3. Atividade Antitumoral de Heparina	36
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. OBJETIVO GERAL	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4. MATERIAIS E METODOS	39
4.1. ANIMAIS E LINHAGEM CELULAR.....	39
4.2. DESENVOLVIMENTO DE TUMOR SUBCUTÂNEO.....	40
4.3. TRATAMENTOS COM AS HEPARINAS	40
4.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	41
4.5. TESTES ESTATÍSTICOS	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1. PADRONIZAÇÃO DO TIPO DE HEPARINA E DOSE UTILIZADA PARA TRATAMENTO	44

5.1.1	Heparina não fracionada leva ao sangramento no animal.....	44
5.1.2.	O tratamento com LMWH leva à diminuição do tamanho do tumoral...	44
5.2.	TUMORES DE ANIMAIS TRATADOS COM LMWH POSSUEM MAIORES ÁREAS DE NECROSE	47
5.3.	TUMORES DE ANIMAIS TRATADOS COM LMWH POSSUEM MENOS MELANINA	48
5.4.	O TRATAMENTO COM LMWH LEVA A MENOR PROLIFERAÇÃO CELULAR E AUMENTO DA APOPTOSE.....	49
5.4.1.	O efeito do tratamento com LMWH sobre a angiogênese.....	51
5.4.2.	A redução da angiogênese e suas consequências.....	53
5.5.	O TRATAMENTO COM LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS, ÁCIDO HIALURÔNICO E PGCS	54
5.6.	O TRATAMENTO COM LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE PGHS	59
5.7.	O TRATAMENTO COM LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE MMPS E AUMENTA A EXPRESSÃO DE RECK.....	63
5.8.	O TRATAMENTO COM LMWH LEVA À REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE TCTP.	68
6.	DISCUSSÃO	71
7.	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. MELANOMA

O câncer é a principal causa de morte de seres humanos no mundo inteiro. Em 2012 foram relatados mais de 8,2 milhões de óbitos em decorrência desse processo. Estima-se que esse número continue a aumentar, podendo atingir mais de 11 milhões de mortes em 2030. Entre os tipos de neoplasias, o melanoma metastático (FIGURA 1) embora não seja o câncer de pele com maior frequência, é o câncer de pele com maior letalidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2014). No Brasil os cânceres de pele representam cerca de 25% do total dos cânceres, desse número o melanoma representa 4% (INCA 2014).

O melanoma surge da transformação maligna das células produtoras de pigmento chamadas de melanócitos. Melanócitos são células produtoras de melanina localizadas na camada basal da epiderme (KONDO; HEARING, 2011).

FIGURA 1. O MELANOMA MALIGNO



Foto ilustrativa de uma lesão de melanoma maligno na pele. FONTE: World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html. Acesso em: 18/11/2012.

O principal fator ambiental que contribui para o surgimento de melanoma é a exposição solar, principalmente em áreas da pele não protegidas, como as mãos e rosto. Entretanto, os fatores genéticos continuam sendo o principal risco para o

desenvolvimento da doença, uma vez que o seu surgimento é predominante em indivíduos de pele pouco pigmentada (caucasianos) (HOUGHTON et al., 2002).

Células que atuam na inflamação como, macrófagos, neutrófilos e linfócitos T ativados também podem participar do processo de desenvolvimento tumoral e metástase no câncer de pele do tipo melanoma, através da liberação de fatores de crescimento, proteases e quimiocinas (GARYBIAN; FISHER, 2010).

O melanoma é um tumor maligno com capacidade de metástase a partir de pequenas massas tumorais (LEITER et al., 2004). O seu desenvolvimento pode ser dividido em seis etapas: 1- surgimento de manchas melanocíticas (comumente chamadas de “pintas”); 2- hiperplasia melanocítica com diferenciação “aberrante”; 3- displasia das manchas melanocíticas, com núcleo atípico; 4- crescimento radial do melanoma primário; 5- crescimento vertical do melanoma primário; 6- melanoma metastático (CLARK et al., 1984) (FIGURA 2). A diferenciação “aberrante”, citada na segunda etapa do desenvolvimento do melanoma, é caracterizada apenas pelo não desaparecimento das células melanocíticas alteradas. Essas manchas são constituídas de melanócitos com proliferação celular descontrolada e focada em uma região (CLARK et al., 1984). Uma vez que o organismo possui mecanismos imunológicos de defesa contra a formação de tumores (BOON et al., 2006), as manchas melanocíticas, na maioria das vezes, não se desenvolvem para tumores primários, tornando-se lesões terminais, que não evoluem para melanoma (HOUGHTON et al., 2002). Mas, se o melanoma se desenvolver a partir de um precursor, a displasia melanocítica serve como “ponto de partida”.

FIGURA 2. OS SEIS NÍVEIS DE CLARK (I - IV)

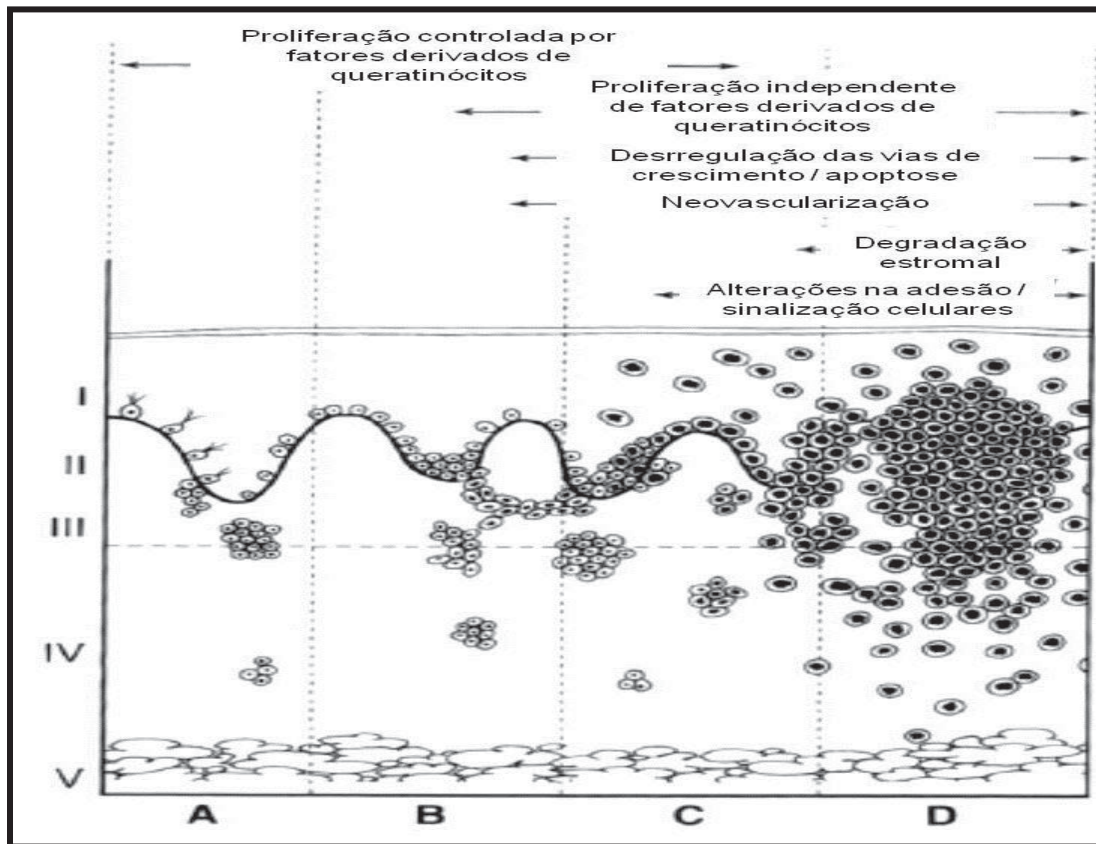
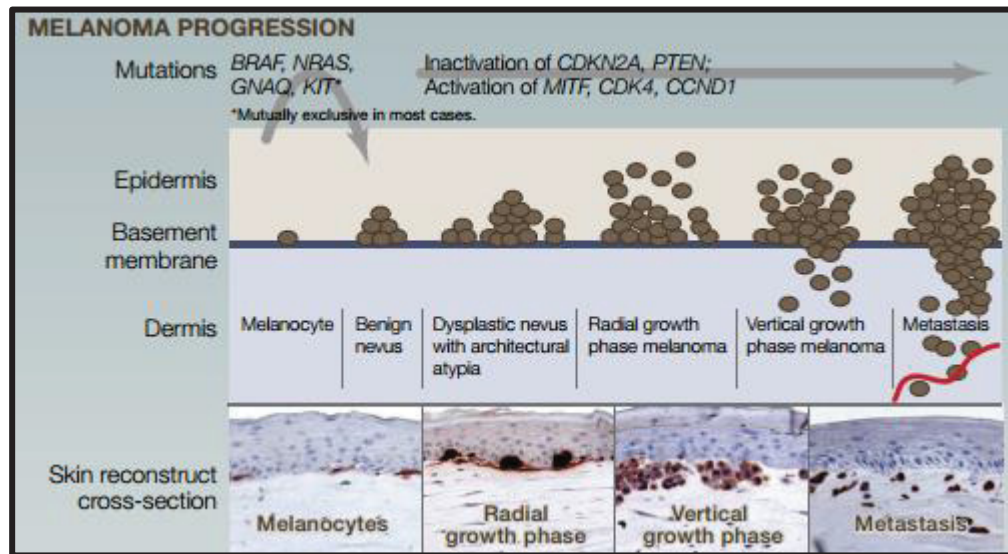


Ilustração de uma secção vertical da pele, incluindo (I) epiderme, (III - IV) derme e (V) tecido subcutâneo. A: Melanócitos normais distribuídos individualmente ou em *pequenos* aglomerados na junção epiderme - dermal. B: Proliferação atípica dos melanócitos. C: Melanoma em crescimento radial (fase RGP). D: Melanoma em crescimento vertical (fase VGP). As mudanças biológicas características de cada nível estão apresentadas no topo da FIGURA. O sexto nível (não ilustrado) é a metástase. Fonte: Adaptado de HOUGHTON (2002).

O melanoma primário cresce de forma gradual, não seguindo um caminho linear de expansão. Inicialmente, ele passa pela fase de crescimento radial (conhecida como fase RGP, do inglês Radial Growth Phase), que é caracterizado pelo alargamento do melanoma em sua periferia, aumentando o diâmetro de sua forma de circunferência imperfeita. Nesta etapa, ainda não ocorre o fenótipo de metástase. A partir do momento em que o melanoma atinge o próximo estágio de desenvolvimento, o crescimento vertical (fase VGP, do inglês Vertical Growth Phase), essas células crescem perpendicularmente ao crescimento radial e adquirem a competência de sofrer metástase. Além disso, crescem de forma expansiva, degradando o tecido adjacente, o que é uma característica da metástase (CLARK et al., 1984) (FIGURA 3).

FIGURA 3. CLASSIFICAÇÃO ATUALIZADA DOS ESTÁGIOS DO MELANOMA



A imagem a acima demonstra a ilustração dos níveis de progressão do melanoma, em comparação com a imagem histológica desse processo. Diferenciando em quatro fases, melanócitos, fase de crescimento radial (RGP), fase de crescimento vertical (VGP) e metástase. Fonte: Adaptado de Vultur, A (2013).

Um fator prognóstico importante para o melanoma, é a profundidade do tumor no diagnóstico histológico. A taxa de sobrevivência de cinco anos para pacientes diagnosticados com melanoma *in situ* chega aos 99,9%, em melanomas com 1.01-2mm de profundidade a taxa de sobrevivência em 5 anos cai para 45-79%. Nestes casos tratamento para melanoma é excisão cirúrgica, com a retirada de aproximadamente 2 centímetros de margens. Além disso, para melanomas com mais de 1 milímetro de profundidade tem a indicação de investigação de metástases em linfonodos. Portanto, quanto menos profundo o melanoma melhor o prognóstico do paciente (CHIARAVALLOTI; LADUCA, 2014).

1.2. TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DOS MELANÓCITOS

A transformação maligna de melanócitos é constituída por vários processos, complexos caracterizados por alterações na expressão de moléculas envolvidas no controle do crescimento celular, proliferação, adesão e morte. Diversos estudos sugerem que a patogênese do melanoma é um processo multi passo que podem

incluir as fases de nevos benignos, nevos displásicos, radial e vertical e metastático melanoma (COMODO et al., 2013).

O processo de transformação de células normais em neoplásicas está associado à moléculas/proteínas que desempenham importantes papéis no controle da proliferação celular. Modificações pós-traducionais, ocasionadas por mutações em genes que codificam para a produção de algumas proteínas envolvidas na ativação ou desativação em processos críticos de sinalização celular, estão envolvidas na transformação e progressão maligna (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

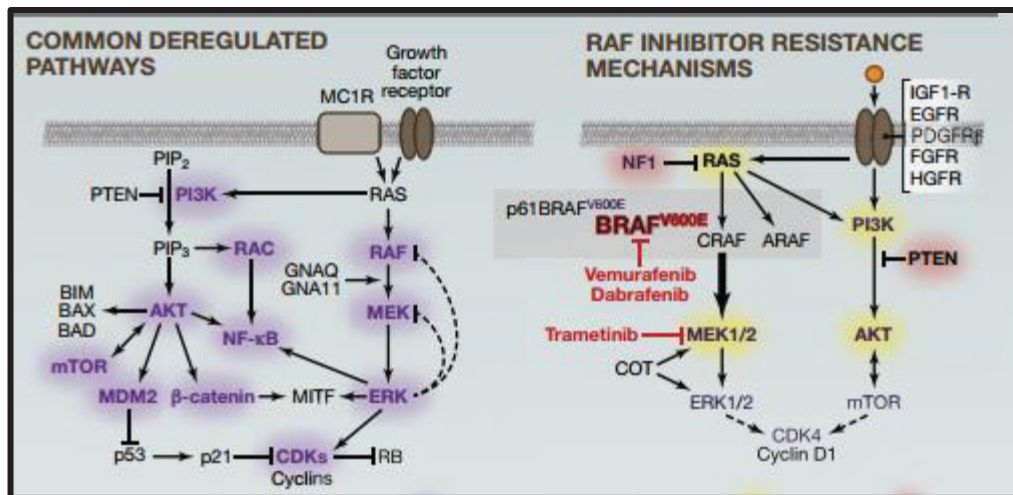
A pele humana ao ser exposta a radiação da luz ultravioleta sofre dano ao DNA dos queratinócitos, o que faz com que a proteína p53 (conhecida por ser supressora tumoral) seja estabilizada e impede progressão do ciclo celular. Por outro lado, p53 ativa a expressão da pró-opiomelanocortina (POMC). Seqüencialmente POMC é clivada, o que por sua vez estimula a produção do hormônio melanócito-estimulante (MSH), que é liberado. Esse hormônio interage com melanócitos, ligando ao receptor melanocortina (MC1R), o que desencadeia uma cascata de sinalização celular, mediada por AMP cíclico e/ou por MAP quinase, que levam ativação do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), estimulando a síntese de melanina. A seguir, a melanina segue em melanossomos e é “entregue” ao queratinócito, levando a um aumento de sua pigmentação, permitindo uma maior proteção dessas células aos danos no DNA ocasionados pela radiação UV (GARYBIAN; FISHER, 2010).

O dano ao DNA causado pela exposição à solar em específico aos raios UV, que altera a via de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK que contribui para o aumento da proliferação celular, onde a ativação de ERK por é grandemente aumentada na maioria dos melanomas humanos. A ativação de ERK é aumentada por conta da mutação em NRAS. Outra mutação importante no processo de transformação maligna dos melanócitos é a da BRAF_{V600E}, BRAF por sua vez troca do ácido glutâmico por valina na posição 600.(GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). A mutação de BRAF_{V600E} e de NRAS são eventos iniciais da transformação dos melanócitos em células malignas, estas alterações estimulam constitutivamente ERK esta estimulação favorece aumento da proliferação das células de melanoma. Esse aumento na proliferação se deve ao número de variantes do MC1R, encontradas principalmente em pele com danos por exposição à luz solar, que nestes casos

aumenta a propensão ao desenvolvimento de melanoma associado a mutações em BRAF (IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

Os receptores de melanocortina pertencem à família de receptores de proteína G em melanócitos e agonistas incluindo hormônio estimulante do melanócito (α -MSH), que ativa a enzima adenilato-ciclase, aumentando o nível intracelular de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), e a ativação de resposta ao cAMP da proteína de ligação ao elemento (CREB). CREB atua como um fator de transcrição de vários genes, incluindo MITF. Além disso, ativa MAPK e membros da sua família, ERK 1/2, quinase c-Jun N-terminal (JNK) 1/2 e p38 MAPK, são conhecidos por serem clivados por uma variedade estímulos extracelulares e favorecerem a proliferação. A radiação UV é um estímulo extracelular típico de tal forma que induz a ativação de MAPK. Estudos recentes têm demonstrado que MAPKs estão implicados na melanogênese em mamíferos. Além disso, espécies reativas de oxigênio (ROS) também desempenham papéis importantes nas vias de ativação de ERK e JNK, que também são moduladores eficazes da ativação de MITF, levando à regulação da melanogênese em mamíferos (PENG et al, 2014) (FIGURA 4).

FIGURA 4. VIA DE SINALIZAÇÃO DO MELANOMA



A ilustração demonstra os mecanismos pelos quais, é desencadeado o crescimento desordenado nos melanócitos, bem como as proteínas envolvidas. Fonte: Adaptado de Vultur, A (2013).

O fator de transcrição p53, regula a expressão de genes envolvidos na interrupção da progressão do ciclo celular e posterior apoptose. Sua inibição é crucial

para o desenvolvimento de muitos tumores, pois ele bloqueia o ciclo celular em caso de dano ao DNA durante a fase de replicação do material genético (Fase S da Interfase). Sendo assim, a p53 também é chamada de proteína de inibição de tumor (WEINBERG, 2014). Em condições normais, o nível de p53 é mantido muito baixo através do efeito de ubiquitinação e degradação por proteossomo pela atividade de uma ubiquitinoligase (HDM2 em humanos, e MDM2 em camundongos). Em condições de estresse, como dano ao DNA, a proteína p53 sofre várias modificações, como fosforilação e acetilação, que a estabiliza e a ativa para a regulação da expressão gênica (REICHRATH, 2014). Entretanto, o aumento da expressão de inibidores de p53, MDM2 e MDM4, é comumente encontrado em células de melanoma, o que sugere que essa proteína constitui um elemento essencial para a transformação maligna dos melanócitos (LU, 2014). Também, a proteína APAF-1, que é uma molécula supressora tumoral e um co-fator da Caspase-9, é considerada como chave para apoptose dependente da p53, e em melanomas metastáticos encontra-se inativada (BIZARRI, et al. 2013). A proteína de supressão tumoral p53 mutada, ocorre 1-5% em melanomas primários e 5-25% em melanomas malignos) são moléculas inibidores de ciclinas, contribuindo de tal forma para o alto índice proliferativo de melanomas malignos (IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

A transformação maligna dos melanócitos também está associada à redução da adesão celular ao substrato. Oba-Shinjo e colaboradores (2006) demonstraram alterações fenotípicas nas células de uma linhagem não tumoral de melanócitos (melan-A), que foram submetidas ao impedimento de ancoragem pela manutenção em suspensão, após sequências de ciclos celulares. Essas células modificadas multiplicaram-se mais rapidamente do que a melan-A e possuíam maiores quantidades de moléculas diretamente relacionadas com a malignidade de células de melanoma como, por exemplo, o Perlecan, um proteoglicano característico da matriz extracelular (MEC) (OBA-SHINJO et al., 2006).

1.3. CRESCIMENTO TUMORAL E ANGIOGÊNESE

A angiogênese associada ao tumor é um passo crítico da tumorigênese, resultado da ação de diferentes citocinas e fatores de crescimento, produzidos por uma variedade de elementos celulares do microambiente tumoral (MACHADO et al, 2014). A formação de um tumor sólido é dependente do fornecimento de nutrientes às células tumorais através dos vasos sanguíneos. Os tumores sólidos são constituídos de células neoplásicas e não-neoplásicas inseridas na MEC. Dentre as células não-neoplásicas que constituem um tumor, as endoteliais vasculares, organizadas em tubos capilares, são as responsáveis pelo fornecimento de nutrientes presentes no sangue. Essas células são atraídas para o tumor através de diversos fatores de crescimento, como por exemplo, o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e então formam uma rede de distribuição de sangue intratumoral, constituído de capilares ligados a vasos extratumorais pré-existentes ou não (LI, et al. 2014).

O VEGF regula a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos. Essa família de fatores de crescimento de células do endotélio vascular é produzida não só pelas próprias células endoteliais, mas também por células estromais e hematopoiéticas. Em mamíferos, existem quatro tipos diferentes de VEGF, nomeados de A a D (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D). Estes compostos são glicoproteínas diméricas de 40 kDa, ligadas por pontes dissulfetos (CÉBE-SUAREZ et al., 2006). Os receptores para os VEGFs, chamados de VEGFRs, são receptores tirosinoquinases. Três deles foram identificados: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. A ligação do VEGFR1 com o VEGF-A ou VEGF-B é a principal via pela qual ocorre a angiogênese. Após a interação do receptor com o ligante, a atividade tirosina quinase do receptor é ativada e desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que leva a ativação de MAPKinase, resultando em um estímulo para a proliferação e migração celular. A diferenciação das células endoteliais e organização em tubos vasculares são dependentes da ativação da PI3K/Akt pela cascata de sinalização iniciada com a ativação do VEGFR1 (KOCH et al., 2011).

A angiogênese tumoral é predominantemente dependente da sinalização celular desencadeada pelos VEGFs, sendo que os dois receptores mais importantes são o VEGFR1 e VEGFR2 (HIRATSUKA et al., 2001). No caso do melanoma, existem

evidências de que o VEGF pode ser produzido por células hematopoiéticas intratumorais, atuando então como um quimioatraente para progenitores de células endoteliais vasculares (MARNEROS et al., 2009). No caso de neutrófilos infiltrados no tumor, estes secretam metaloproteases (MMP) (com p.ex. MMP-9), que por sua vez degradam a MEC, liberando fatores de crescimento que se encontravam retidos (dentre eles o VEGF), o que contribui com a angiogênese (NOZAWA et al., 2006). De modo semelhante, progenitores de células dendríticas infiltrantes foram também identificados como promotores da angiogênese tumoral através da produção de VEGF (CONEJO-GARCIA et al., 2004).

Utilizando o modelo de crescimento tumoral subcutâneo de melanoma murino, constatou-se que camundongos deficientes para o receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1R) possuem menor crescimento tumoral, devido à menor quantidade de vasos intratumorais, e, portanto, angiogênese tumoral reduzida. Além disso, verificou-se que o tecido da periferia tumoral é rico em células positivas para um marcador de macrófagos, o F4/80, e que essa marcação é mais evidente em camundongos do tipo selvagem, que possuíam a expressão do AT1R em suas células, quando comparado com o deficiente para AT1R (AT1R^{-/-}). E por fim, foi verificado que estes macrófagos produziam VEGF (EGAMI et al., 2003). Além disso, o bloqueio do receptor AT1R por uma droga anti-hipertensiva chamada Losartana mostrou-se eficaz na redução do crescimento tumoral subcutâneo de melanoma murino. Os animais tratados com o Losartana possuíam tumores menores e com menos vasos sanguíneos tumorais. Também, a expressão de VEGF intratumoral foi significativamente reduzida. Além do mais, tumores oriundos de pacientes humanos mostraram positividade na imunohistoquímica, para a angiotensina II (OTAKE et al., 2009).

Sendo assim, uma vez que a inibição da angiogênese tumoral através de bloqueadores do sistema angiotensina para a produção de novos vasos é baseada na redução da expressão de VEGF intratumoral, ou por redução da quantidade de células VEGF positivas na periferia tumoral. (GARDLIK et al., 2011). Afinal, além do fato da angiotensina II por si só ser um fator angiogênico, nas células endoteliais a cascata de sinalização intracelular iniciada pela ligação da angiotensina II com o seu receptor leva à expressão de VEGF (DESHAYES et al., 2005).

A angiogênese desempenha papel fundamental na progressão tumoral, células envolvidas na angiogênese, como as células progenitoras endoteliais (EPCs) também podem ser alvos terapêuticos. Muitos estudos sugerem células progenitoras endoteliais envolvidas na angiogênese tumoral, estas células são seletivamente recrutadas dentro da massa tumoral. A quantidade de EPCs circulantes correlaciona-se positivamente com a progressão do tumor e seus níveis diminuem após a quimioterapia. Além disso, as células-tronco mesenquimais (MSCs) são capazes de suportar a angiogênese tumoral e o desenvolvimento do tumor, fornecendo a matriz necessária para novos vasos. Devido à sua capacidade para viver dentro de tumores, EPC e MSC pode ser proposto para ser utilizado na "terapia celular" anti-câncer, como veículos de celulares para a entrega de moléculas que inibem a progressão do câncer (LAURENZANA et al, 2014).

1.4. METÁSTASE

A metástase é um processo complexo que ocorre através de uma série sequencial de passos que incluem a invasão de tecidos adjacentes, a entrada e transporte no sistema circulatório e o extravasamento e crescimento em um órgão secundário (WEINBERG, 2012).

A capacidade metastática consiste na habilidade das células tumorais de se estabelecerem em distintos órgãos em relação a sua origem (como, por exemplo, no cérebro, no pulmão e/ou no fígado, entre outros), formando colônias secundárias, o que dificulta a eliminação total dos tumores por via cirúrgica. Essa capacidade metastática é decorrente de vários fatores, dos quais se destaca a habilidade da célula tumoral de se tornar não "visível" à vigilância imunológica (um conjunto de células de defesa e moléculas bioativas altamente competentes e controladas), que atuam proporcionando o equilíbrio do organismo (WEINBERG, 2012).

A entrada e transporte no sistema circulatório podem acontecer através dos próprios vasos oriundos da angiogênese tumoral. Ao entrar na corrente sanguínea as células tumorais precisam sobreviver nesse ambiente considerado hostil para elas, uma vez que o organismo conta com um sistema de defesa contra células tumorais, protagonizados pelas células NK (*Natural Killers*). Essas células da imunidade inata

possuem a capacidade de reconhecer células tumorais que não expressam o complexo de histocompatibilidade e de estimular a via extrínseca da apoptose através de seus receptores da família dos fatores de necrose tumorais (TNFs), dentre eles o Fas ligante, que leva à ativação de caspases e posterior apoptose da célula tumoral (LOOSE et al., 2009). Apesar disso, as células tumorais possuem mecanismos para escapar da imunidade antitumoral. Dentre eles está a agregação de plaquetas nas células tumorais, através do Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas PDGFR, onde as células tumorais aderem à plaquetas em seu redor. Essa agregação plaquetária protege as células tumorais das células NK. Esta proteção consiste na formação de uma camada ao redor das células tumorais, impedindo o contato dessas com as NK. Também, essa agregação constitui uma proteção contra forças mecânicas geradas pelo atrito com a parede dos vasos. E, uma vez que a estrutura formada é de grande diâmetro, ela contribui para a formação de êmbolos, o que favorece a metástase para órgãos que possuem vasos de pequenos diâmetros como, por exemplo, os pulmões (GUPTA et al., 2004). Embora a formação de êmbolos contribua com a metástase, sabe-se que este processo ocorre em órgãos específicos, e não aleatoriamente.

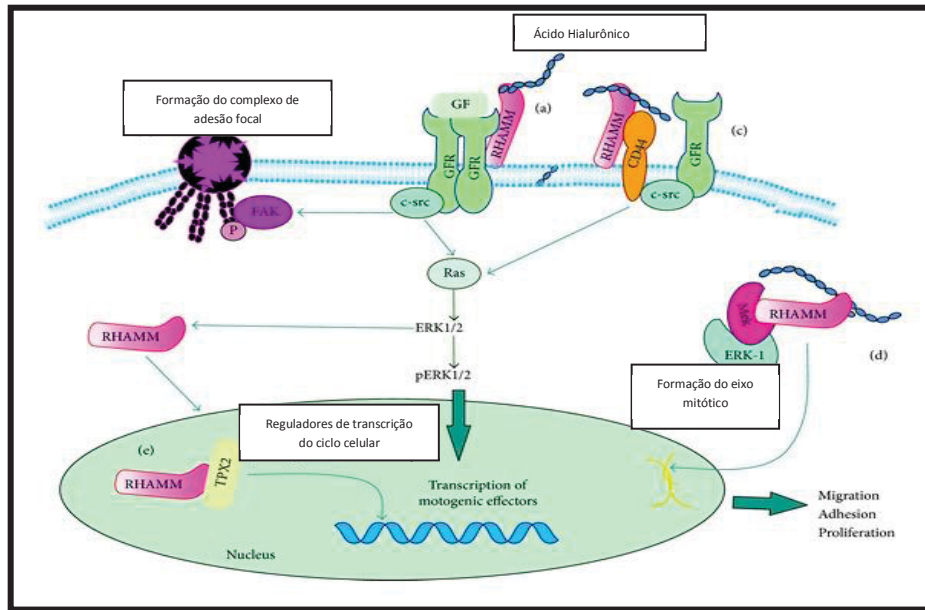
Para extravasar da circulação sanguínea, a célula tumoral precisa reconhecer receptores específicos ligados ao endotélio vascular, aumentar a permeabilidade dos vasos, extravasar a partir destes e, finalmente, alcançar o tecido a ser colonizado. Então, ocorre proliferação celular e angiogênese tumoral (FIDLER, 2002).

Inicialmente, para o estabelecimento da célula tumoral nesse novo ambiente, ela precisa interagir com os componentes da MEC. Sabe-se que a ligação entre o receptor para o ácido hialurônico dos fibroblastos, o CD44 do melanoma, contribui com a invasão tecidual e estabelecimento das células metastáticas (MEHLEN et al., 2006), pois desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, que resulta na síntese de fatores de crescimento, como o FGF-2 (Fator de crescimento de fibroblasto - 2) e TGF β (Fator de crescimento transformante β), promovendo assim a proliferação celular. Além disso, o TGF β promove imunossupressão e proteção contra apoptose.

Essa ligação também ocasiona a ativação do fator de transcrição NF κ -B, ativando genes para a produção de metaloproteases (MMP-2, MMP-7 e MMP-9) responsáveis por remodelar a matriz extracelular contribuindo com a invasão tecidual

(SIRONEN et al., 2011), bem como atuando na liberação de ectodomínio de proteoglicanos de superfície celular, mecanismo conhecido como “shedding” (FIGURA5).

FIGURA 5. INTERAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO COM SEUS RECEPTOR PRESENTES NO MELANOMA



A figura acima ilustra como ocorre a cascata de sinalização intracelular desencadeada pela interação do ácido hialurônico e seus receptores CD44 e RHAMM. Fonte: SIRONEN e colaboradores (2011).

O papel da CD44 na progressão de melanoma humano tem sido principalmente caracterizado, por alterações qualitativas na expressão dos seus exons variáveis individuais, assim o melanoma humano apresenta variáveis de uma mesma isoforma de CD44, ocorrendo maior expressão de CD44 em diferentes variáveis (RASO-BARNETT et al., 2011).

Além do CD44 existem outros biomarcadores tumorais no melanoma, como a Proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP), que é um indicador de mau prognóstico. Sua ação está relacionada à proliferação, morte celular em situações fisiológicas, mas também está relacionado à reversão tumoral e resposta ao stress (TELERMAN; AMSON, 2009).

1.5. MODELOS BIOLÓGICOS DE CRESCIMENTO TUMORAL E METÁSTASE EXPERIMENTAL

A biologia tumoral pode ser estudada através de modelos biológicos animais, os quais provêm uma alternativa para caracterização e estudo de tratamentos para tumores malignos (CHAPMAN et al., 2011; PAWELETZ et al., 2001). Dentre os modelos comumente utilizados na pesquisa encontram-se o de crescimento tumoral e o de metástase experimental. Estes modelos podem ser obtidos utilizando linhagem celular B16-F10 de melanoma murino, inoculada em camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem C57BL/6 (FIDLER, 1973).

O modelo de crescimento tumoral da B16-F10 é baseado na injeção subcutânea das células no flanco dorsal ou abdominal dos animais. Após aproximadamente 10 dias, é visível e palpável um tumor sólido subcutâneo (GIAVAZZI et al., 2001). O tamanho e a massa desse tumor sólido, bem como o número de vasos intratumorais e áreas de morte celular, são parâmetros comumente utilizados para avaliar a possível eficácia de agentes terapêuticos contra o câncer (OTAKE et al., 2009; YOSHIURA et al., 2009) bem como estudar a biologia de tumores (IMAI et al., 2007; EGAMI et al., 2003).

O modelo de metástase experimental baseia-se na injeção de células tumorais B16-F10 direto na circulação sanguínea, para posterior invasão e colonização pulmonar (GIAVAZZI et al., 2001). A via de entrada para a circulação é a veia caudal (FIDLER, 1973; WELCH, 1997). Após 15 dias da injeção, os pulmões dos animais inoculados ficam repletos de nódulos melanocíticos distribuídos de maneira homogênea em todo o pulmão (ELKIN et al., 2001). Esses nódulos podem ser contados, e existe uma correlação entre o número de nódulos formados com a malignidade das linhagens de melanoma, quando diferentes linhagens são comparadas entre si (NAKAMURA et al., 2002). Também, esse parâmetro é comumente utilizado para avaliar a eficácia de agentes anti-neoplásicos em reduzir a colonização pulmonar (OTAKE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010; CONESA et al., 2009).

1.6. TRATAMENTOS CLÍNICOS DE MELANOMA

É clinicamente reconhecido que cânceres, de uma forma geral, quando em processos de metástases avançadas, são geralmente insensíveis aos tratamentos convencionais. Esses além de pouco eficientes, possuem diversos efeitos colaterais, levando geralmente ao comprometimento da qualidade de vida dos pacientes.

A eficácia da quimioterapia na maioria dos tipos de câncer melhorou nas últimas décadas, entretanto os efeitos colaterais tóxicos decorrentes dos tratamentos convencionais causam notória redução da qualidade de vida dos pacientes. Portanto, o descobrimento de novos medicamentos contendo substâncias mais eficazes e menos tóxicas continua sendo um desafio (KESSLER et al., 2006; SUFFREDINI et al., 2006; SIENA, 2008).

Na atualidade existem 4 tipos de terapia para o tratamento de melanoma metastático, com comprovação científica e aprovação para uso nos Estados Unidos. Sendo elas, dacarbazina, interleucina2 (IL-2) recombinante, inibidores de BRAF_{v600E} e imunoterapia com o anticorpo “Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4”(CTLA4) (FINN; MARKOVIC; JOSEPH, 2012).

A dacarbazina é um quimioterápico para tratamento de melanoma maligno, sua ação anti-neoplásica é devido a incorporação do fármaco ao DNA das células durante a proliferação, causando dano no DNA e conseqüente morte celular (CHAPMAN, 2011). Pacientes tratados com dacarbazina apresentaram sobrevida menor que 6 anos, a dacarbazina foi o primeiro medicamento utilizado para o tratamento do melanoma metastático (FINN; MARKOVIC; JOSEPH, 2012).

A IL-2 é uma molécula do sistema imune, que tem por função ativar as células com atividade citotóxica, contra infecções intracelulares e desenvolvimento tumoral. A IL-2 recombinante é uma molécula utilizada para aumentar a eficácia da atividade citotóxica, promovendo a ativação de linfócitos T auxiliares. Pacientes submetidos a essa terapia tinham sobrevida inferior a 1 ano (KAUFMAN et al., 2013).

O antígeno associado ao linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4) é uma molécula de checkpoint imune que sub-regula as vias de ativação das células T, quando este liga-se aos seus ligantes, impede ativação e proliferação dos linfócitos T citotóxicos, por meio da ativação de uma cascata de sinalização intracelular. O ipilimumab, é um

anticorpo monoclonal tipo IgG1 que bloqueia CTLA-4 promovendo imunidade antitumoral, este anticorpo demonstrou atividade antitumoral em pacientes com melanoma maligno. Porém, a sobrevida de aproximadamente 89% dos pacientes foi inferior a 36 meses (KAUFMAN et al., 2013).

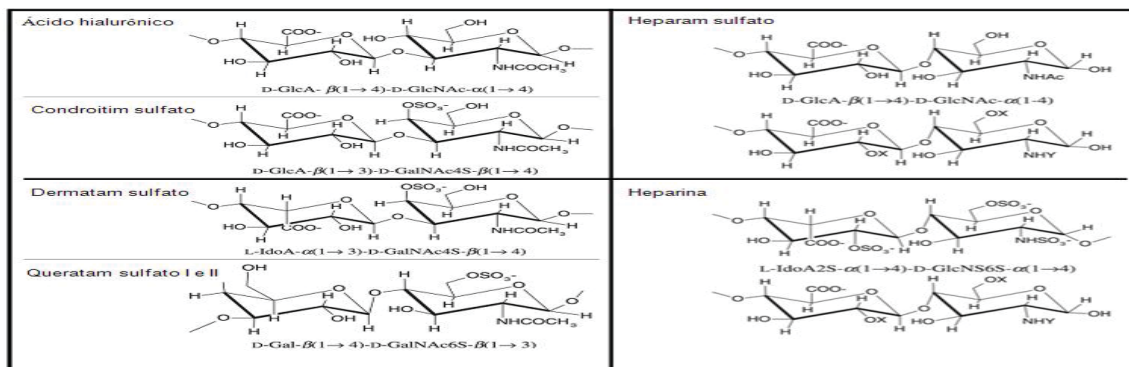
Os inibidores de BRAF_{V600E} como, o Vemurafenib PLX4032 RAF inibe a proliferação de células tumorais, bloqueando a atividade de MAPK/ERK das células tumorais que possuem o gene mutado BRAF_{V600E}. Estudos explicam que a droga inibe seletivamente o crescimento de tumores com mutação em BRAF_{V600E}, embora o tratamento seja seletivo a sobrevida dos pacientes ainda sim é baixa, com aproximadamente 40% dos pacientes com sobrevida acima de 18 meses (KAUFMAN et al., 2013).

1.7. POLISSACARÍDEOS

1.7.1 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos sulfatados e não sulfatados

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares formados por cadeias polissacarídicas não ramificadas, compostas de unidades dissacarídicas repetitivas, as quais são constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina), unida por ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado. Este, por sua vez, pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-irudônico) ou um açúcar neutro (D-galactose). Estes polímeros diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, quanto ao grau de sulfatação e a posição em que são sulfatados, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intradissacarídica (GANDHI; MANCERA, 2008). Variam a massa molecular entre 10-100 kDa. Os principais tipos de GAGs são: não-sulfatado como o ácido hialurônico, e os sulfatados que incluem condroitins sulfato (CS – sendo 4 e/ou 6 sulfato), dermatam sulfato, queratam sulfato, heparam sulfato e heparina (GANDHI; MANCERA, 2008). A unidade estrutural de cada GAG está representada na FIGURA 6.

FIGURA 6. UNIDADE ESTRUTURAL DOS GLICOSAMINOGLICANOS



A figura acima ilustra a estrutura química básica dos glicosaminoglicanos. Fonte: Adaptado de GANDHI; MANCERA (2008).

Com exceção do ácido hialurônico, os GAGs são encontrados ligados covalentemente às proteínas, formando os proteoglicanos (MATHEWS, 1975). Estes compostos participam em muitos processos biológicos, por meio da regulação das várias proteínas associadas. Essas moléculas estão presentes nas superfícies de células animais e na matriz extracelular, e algumas estão relacionadas com a ligação e regulação de um grande número de proteínas, incluindo citocinas, fatores de crescimento, enzimas, moléculas de adesão, entre outras (GANDHI; MANCERA, 2008). Assim, estes compostos são capazes de participar em diversos processos fisiológicos e patológicos, com destaque para a atuação no desenvolvimento de angiogênese e, conseqüentemente, na progressão de tumores, em caso de metástases.

Vale destacar que o ácido hialurônico mostra ter papel crucial no crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases (FIGURA 5). Como é um componente importante da MEC, interações entre tumor e estroma têm um papel central na biologia do câncer. O microambiente do tecido circundante ao tumor, em especial os fibroblastos associados ao tumor, dão suporte para o crescimento tumoral, motilidade e metástase. Assim, a dinâmica da matriz extracelular tem demonstrado contribuir para a progressão tumoral, cuja molécula abundante é o ácido hialurônico (AH).

O AH é composto pela repetição de unidades dissacarídicas (N-acetilglucosamina e ácido D-glucurônico). Aumento da produção desta molécula de açúcar tem demonstrado aumentar a proliferação, invasão e metástase em células tumorais, além de promover a resistência a drogas e levar a um pior prognóstico para

o paciente (SIISKONEN et al., 2012). Tumores que tem ácido hialurônico abundante no seu estroma, como o melanoma possuem vantagem no crescimento neoplásico, em comparação aos que não possuem este GAG. O ácido hialurônico promove a angiogênese, devido a sua clivagem em pequenos fragmentos que ligam sinalizam a produção de fatores de crescimento, modula a resposta antitumoral por meio da imobilização das células inflamatórias, dá suporte a motilidade das células tumorais e aumenta a proliferação (WILLENBERG et al, 2012).

Por outro lado, além do AH, vários estudos também mostram um papel importante na progressão tumoral do seu principal receptor, o CD44. Vale ressaltar que o CD44 está envolvido na cascata de sinalização intracelular de processos cruciais para a célula como diferenciação, crescimento, migração, ativação linfocitária e progressão tumoral, onde suas funções são dependentes da ligação ao ácido hialurônico (FJELDSTAD, 2005). Assim, o aumento na expressão de CD44 e, conseqüentemente, da interação com ácido hialurônico, atua de forma a aumentar a progressão tumoral e a propensão metastática do melanoma. Ainda, a interação mediada por AH e CD44, leva a uma interação com o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e promovem a motilidade da célula de melanoma, pela ativação da proteína quinase C (STAMENKOVIC, 2009).

Já o Proteoglicano de condroitim sulfato 4 Humano (PGCS4), originalmente conhecido como Antígeno de alto peso molecular associado ao melanoma (HMW-MAA) ou como Proteoglicano de Condroitim Sulfato do Melanoma (MCSP), foi identificado há mais de 30 anos em células humanas de melanoma. O proteoglicano correspondente em camundongos e ratos é conhecido como NG2 (Antígeno nervo-glial2) (PRICE et al, 2012).

PGCS pode afetar a progressão tumoral, através de suas múltiplas funções já documentadas. Estas incluem, entre outras, acoplamento de receptores para sinalização de fatores crescimento, atividade modulatória de metaloproteinases, sequestro de angiostatina, ligação de superfície a galectina-3, modulação da atividade de integrina e promoção da angiogênese (CATTARUZZA, 2013).

O Proteoglicano de heparam sulfato (HSPG) são macromoléculas localizadas na matriz extracelular e na superfície da célula. Eles consistem de um núcleo protéico de heparam sulfato ligado covalentemente cadeias de glicosaminoglicanos HSPG

superfície celular, como membros das famílias sindecam e glipicam, regulando o a comunicação entre células tumorais e células normais adjacentes ao tumor, agindo como co-receptores para fatores de ligação ao HS. Estas funções únicas fazem que o HSPG tenha papel muito importante na integração de sinalização celular. Características de expressão HSPG estão ligadas a metástases do tumor. Os HSPGs são alvos de heparanase (HPSE), uma endoglicosidase de mamíferos (endo- β -d-glucuronidase) cuja atividade tem sido amplamente implicada na metástase. A HPSE cliva HS em sítios específicos intracadeia, resultando em fragmentos (10-20 subunidades açúcar) que são biologicamente ativos, por exemplo, capazes de se ligar de a fatores crescimento e fatores angiogênicos (RIDGWAY et al, 2010).

Os sindecans são uma família de quatro proteoglicanos de heparam sulfato transmembrana de superfície celular, que servem principalmente como co-receptores, para regular a transdução do sinal dependente de aderência de uma variedade de tipos de células, incluindo receptores de adesão celular ou co- receptores de células cancerosas desempenham um papel crítico na transformação neoplásica das células normais, através da regulação da indução de comportamento e morfologia celular específica do câncer. No melanoma os sindecans super expressos são, 1,2 e 4(LEE et al, 2009).

O Sindecam-1 (CD138), um dos quatro membros da família sindecam, é um Proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) de superfície celular composto por um domínio extracelular, uma proteína transmembrana de passagem única e uma curta porção citoplasmática e domínio C-terminal conservado. A proteína é expressa predominantemente em células epiteliais. As características estruturais dos HS correntes são responsáveis pela interação de sindecans com um número de fatores solúveis, incluindo fatores angiogênicos tais como o VEGF e Fator de Crescimento-2 (FGF-2), as moléculas associadas às células e componentes da matriz extracelular (ECM). Sindecam-1 tem mostrado ser um co-receptor associado com o seu domínio extracelular, para os $\alpha\beta 3$ e $\alpha\beta 5$ integrinas, regulando potencialmente a adesão, proliferação, invasão e angiogênese de células que expressam estas integrinas, como em carcinoma de mama humano (ORECCHIA et al, 2013).

Sindecam-2 também é um PGHS transmembrana, que desempenha papel um crucial na regulação da atividade tumoral. Onde níveis aumentados de sindecam-2,

em câncer de pulmão demonstram fenótipo invasivo. O Sindecam-2 é expresso em altos níveis em glioma de camundongo, demonstrando regular a angiogênese e favorecer a um comportamento metastático do tumor (LEE et al, 2009).

O Sindecam-4 potencializa sinalização Wnt5a e aumenta a invasão e metástase das células de melanoma. Os níveis na superfície celular de sindecam-4 são reduzidos por sinalização Wnt5a, que promove a sua ubiquitinação e degradação regulando assim a adesão celular e migração. Sindecam-4 interage com quimiocinas através das cadeias heparan sulfato e promove a migração de células tumorais e invasão, mas também regula a invasão de células que expressam K-ras mutante, em colágeno com integrina $\alpha 2\beta 1$ e MT1-MMP (LABROPOULOU et al, 2013).

O Perlecan é o mais abundante PGHS da MEC nas membranas basais de células epiteliais e endoteliais, o Perlecan demonstrou promover o comportamento invasivo de células tumorais. Estudos “*in vivo*” mostraram que, a baixa expressão de Perlecan inibe o crescimento tumoral e angiogênese, e a supressão do comportamento invasivo do melanoma foi demonstrada “*in vitro*” (REILAND et al, 2004).

As metaloproteinases (MMPs) de matriz são enzimas dependentes de zinco, que degradam diferentes proteínas de matriz extracelular. Sendo cerca de 26 tipos de MMPs, classificadas em 5 grupos diferentes de acordo a estrutura e o seu substrato específico, tais como, colagenases, gelatinases, estromelisinases e metaloproteinases de membrana (MT-MMPs). A expressão constitutiva dessas moléculas é baixa em condições normais, mas sua expressão pode ser elevada quando ocorre o remodelamento da matriz em condições fisiológicas ou patológicas. As MMPs desenvolvem um papel crucial em processos fisiológicos e patológicos do remodelamento da MEC durante a angiogênese, cicatrização, embriogênese e metástases. Na metástase do melanoma o remodelamento e degradação da MEC, ocorrem durante a invasão da célula tumoral degradando a MEC circundante que invade o tecido até os vasos sanguíneos, extravasando e colonizando órgãos distintos (DYE et al, 2013).

Tanto MMP-2 e MMP-9 são metaloproteases do tipo gelatinase, a MMP-2 liga-se diretamente a $\alpha \beta 3$ integrina, que é uma molécula reguladora da ativação de MMP-2 durante o processo de migração da célula tumoral. A MMP-2 ativa primeiro é

recrutada para a borda das células tumorais invasoras e se une com fibronectina, clivando-a em produtos mais curtos de fibronectina. Os fragmentos de fibronectina promovem o recrutamento integrina $\alpha\beta_3$, para a área onde existem estes produtos fibronectina clivada para facilitar a aderência de células tumorais e migração destas células. Coletivamente, a adesão e a migração são mediadas por integrina $\alpha\beta_3$ de células tumorais, que é regulada pelo menos em parte, por MMP-2 via clivagem de fibronectina (YANG et al, 2012).

A MEC desempenha um papel importante na modulação de MMPs em estados fisiológicos e patológicos. O grau de expressão de algumas MMP tem sido correlacionado com a fase da doença e ou com o prognóstico. MMP-9 degrada o colágeno tipo I em certas condições, em situações patológicas permitindo que as células tumorais possam degradar a MEC que cerca o tumor primário, que conduz a invasão e metástase. Regulação de MMP-9 é dependente de ativação do sinal extracelular regulada pela quinase ERK. O pior prognóstico é observado em tumores que possuem super expressão de ERK, o que regula positivamente a expressão de MMP-9 aumentando a invasividade das células tumorais (KIM et al, 2014).

A metaloproteinase de matriz de membrana do tipo 1 (MT1-MMP) é super expressa no melanoma, sua expressão está relacionada ao prognóstico pior por sua expressão estar relacionada, ao crescimento tumoral, invasão e metástase. Em alguns cânceres estimula o processamento de colágeno e ou ativação de fatores de crescimento, que promovem a resistência a drogas. O VEGF-A está diretamente associado à super expressão de MT1-MMP, pois a atividade catalítica desta metaloproteinase regula a expressão deste fator, que estimula o crescimento endotelial e auxilia nos processos de crescimento tumoral e metástase (PAHWA et al, 2014).

Remodelação da matriz é majoritariamente realizada por um grupo de enzimas, proteases, proteoglicanases e responsáveis por degradar vários componentes da matriz. As catepsinas, serina-proteases, e metaloproteases são as principais classes de proteases envolvidas na invasão de células de câncer. Embora estas enzimas sejam muito críticas para invasão e metástase dessas células, sua expressão, ativação e propriedades funcionais são fortemente reguladas. Os níveis de expressão destas enzimas, assim, muitas vezes não se correlacionam com a capacidade de

invasão das células ou com a progressão da doença. Por exemplo, regulação da degradação da matriz pelas MMPs pode ocorrer em diversos níveis, como, a secreção basal de MMPs (I), a indução da sua secreção (II), em resposta a estímulos externos, isto é, a aderência à componentes matriz extracelular (MEC) ou membrana basal (MB), para a localização da frente invasiva e a sua ativação (III), na proximidade da célula invasora, ou inibição da sua atividade por inibidores de metaloproteinases específicas como TIMPs (IV). A expressão das metaloproteinases correlaciona-se positivamente com potencial metastático e invasivo de vários tipos de câncer, como de mama e colorretal (RANJAN; KALRAIYA, 2014).

As TIMPs são uma família de proteínas reguladoras de MMPs. TIMP-1 é uma proteína que regula a enzima MMP9 que tem a capacidade de degradar o colagênio tipo IV, desempenha um papel-chave nos estágios iniciais da invasão tumoral e metástase, e é inibida por TIMP-1. O desequilíbrio na produção de MMP-9 juntamente com a expressão de TIMP-1, estão envolvidos na regulação da degradação MEC, afetando, assim, a invasão tumoral e metástase. MT1-MMP é uma MMP ligada à membrana que desempenha um duplo papel na degradação de MEC no processo invasão tumoral. MT1-MMP pode ativar proMMP-2 e degradar um número de componentes da MEC, promovendo assim a invasão tumoral e metástases. No melanoma primário e metastático, a expressão das enzimas MMP-2 e MT1-MMP é aumentada. As células de melanoma que tem aumentada a expressão de MMP-2 e MT1-MMP são cruciais no processo de invasão de melanoma. As células de melanoma que expressam a MMP-2 também mostraram co-expressão de MT1-MMP e de TIMP-2. TIMP-2 serve para preencher a interação entre MMP-2 e MT1-MMP. Em baixas concentrações TIMP-2, proMMP-2 é ativado por MT1-MMP livre. Em concentrações intracelulares elevadas de TIMP-2, a maioria das MT1-MMP forma complexos com TIMP-2, que funcionam como receptores para a proMMP-2. O complexo ternário de MT1-MMP / TIMP-2 / proMMP-2 interagem com o lado livre de MT1-MMP alterando proMMP-2. No geral, este processo diminui parcialmente a ativação de proMMP-2 (JUNG et al, 2014).

Os inibidores teciduais de metaloproteinases denominados TIMPs, sendo TIMP-1, 2, 3, e 4, que regulam a atividade multifuncional das metaloproteinases. Entre os membros de TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 são mais frequentemente investigados

porque são membros da família TIMP e envolvidos na progressão tumoral e metástases. Estudos recentes têm começado a desvendar as vias moleculares que ligam a inflamação e câncer. Condições inflamatórias podem iniciar ou promover a transformação oncogênica e alterações genéticas e epigenéticas em células malignas. O microambiente inflamatório suporta ainda a progressão tumoral (SUN, 2010).

Proteínas denominadas proteínas de reversão ricas em cisteína (RECK), demonstram papel importante na inibição das metaloproteinases. Estudos demonstram que RECK é capaz de inibir, MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9. E estas metaloproteinases também estão envolvidas em processos de apoptose, angiogênese, ativação da resposta imune, e crescimento de células tumorais. A inibição da atividade de metaloproteinases por RECK se dá, pelo seqüestro destas moléculas na superfície celular (MENG et al, 2008).

1.7.2. Heparina e atividade antitumoral

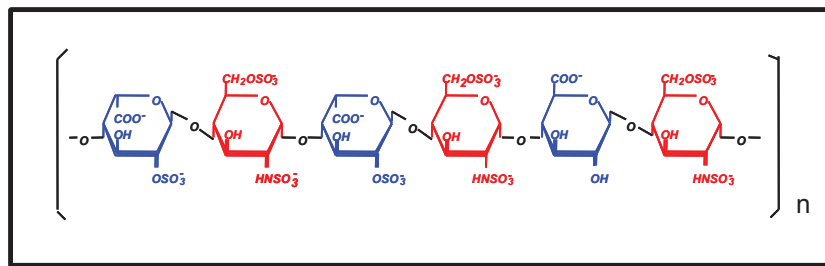
Historicamente a heparina foi descoberta em 1916 por Jay Mclean, que isolou uma substância com potente efeito anticoagulante. No entanto, posteriormente verificou-se que era, na verdade, um fosfolípido. Em 1922, Howel descreveu sob o mesmo nome de heparina um carboidrato com atividade anticoagulante bem maior que o anterior, extraído também do fígado canino, mas foi obtida de solução aquosa e precipitação por acetona. Este composto que é conhecido como heparina até hoje e tem sido utilizado desde a década de 50 como agente anticoagulante de escolha (WARDROP; KEELING, 2008).

A heparina é composta por unidades hexassacarídicasoctossulfatadas repetitivas, constituída essencialmente de dois tipos de dissacarídeos: um trissulfatado e outro dissulfatado, respectivamente na proporção 2:1. Assim as cadeias de heparina são constituídas de dissacarídeos contendo ácido urônico e α -D-glicosamina. Os resíduos de ácidos urônicos são do tipo α -L-idurônicos (70-80%) e β -D-glucurônico (20-30%), sendo que a maioria dos resíduos de ácido L-idurônico são sulfatados no carbono 2 (C-2, sendo 70-80%), enquanto que o ácido D-glucurônico, raramente encontra-se sulfatado. As ligações glicosídicas intradissacarídicas são do

tipo α (1 \rightarrow 4) ou β (1 \rightarrow 4) e as interdissacarídicas são do tipo α (1 \rightarrow 4) (MUÑOZ; LINHARDT, 2004).

A heparina é muito conhecida pela sua principal função farmacológica, que é a atividade anticoagulante. O foco central dessa ação consiste em ativar a velocidade de inibição da antitrombina (AT), um componente inibitório de diversas enzimas da cascata da coagulação sanguínea (NADER *et al.*, 2004). No entanto, essa é uma atividade farmacológica, mas acredita-se que seja pouco provável que a função biológica da heparina esteja relacionada à atividade anticoagulante. A favor desta hipótese está o fato de que muitas espécies que não possuem heparina apresentam mecanismos de coagulação sanguínea normais. Por outro lado, outras espécies, que não apresentam sistema de coagulação sanguínea apresentam grandes quantidades de heparina (como crustáceo, p.ex.) (NADER *et al.*, 2004; SAMPAIO *et al.*, 2006) (FIGURA 7).

FIGURA 7. UNIDADE HEXASSACARÍDICA BÁSICA DA HEPARINA



A hexosamina da heparina é a α -D-glicosamina e o açúcar não nitrogenado é o ácido urônico. A FIGURA acima ilustra a unidade hexassacarídea básica, onde mostra que a heparina é composta principalmente por dois tipos de dissacarídeos, um composto por α -D-glicosamina, N,6-dissulfatada, unida por ligação α (1 \rightarrow 4) ao ácido α -L-idurônico 2,O-sulfatado, e outro dissacarídeo de α -D-glicosamina, N,6-dissulfatada, unida ou a um ácido α -L-idurônico por ligação α (1 \rightarrow 4), ou a um ácido α -D-glucurônico, por ligação do tipo α (1 \rightarrow 4). Fonte: NADER e colaboradores (2004).

Nas últimas décadas surgiram heparinas de baixo peso molecular com cadeias menores de 2,5 KDA (LMWH) que são obtidas por despolimerização química ou enzimática de moléculas de heparina não fracionada. As LMWHs ocasionam um efeito anticoagulante adequado com menor quantidade, se comparado com a heparina não fracionada, mas minimiza seus efeitos colaterais, como a hemorragia por administração deste fármaco (YAU *et al.*, 2011).

Outra aplicação de heparina está no uso em pacientes com processos tumorais, especificamente aqueles portadores da Síndrome de Trousseau. Essa síndrome foi descrita em 1865 por Armand Trousseau e é definida como qualquer desordem tromboembólica que precede um diagnóstico de câncer ou que é diagnosticada simultaneamente (VARKI, 2007). Vale ressaltar que vários fatores estão associados com o desenvolvimento dessa síndrome, como os altos níveis de fator tecidual (TF) na superfície de vários tipos de células tumorais. A ação do TF consiste na ativação de proteases pró coagulatórias ou pela invasão de células tumorais no lúmen dos vasos sanguíneos, como é o caso de tumores metastáticos (RAK et al., 2006). Outro fator é a produção de mucinas, as quais são altamente glicosiladas, pelas células epiteliais. Em células tumorais, elas são glicosiladas de modo anormal, e então secretadas na corrente sanguínea, ativando a coagulação (VARKI, 2007). Nesses pacientes o uso de heparina demonstrou ser mais eficiente no tratamento desta síndrome do que com inibidores de vitamina K (BORSIG, 2004). Atualmente heparina ainda é o anticoagulante de escolha, pois é capaz de ativar a antitrombina, inibindo a interação entre as selectinas, que por sua vez, interrompem a ligação das mucinas (AFRATIS et al., 2012).

1.7.3. Atividade Antitumoral de Heparina

Como discutido acima, considerando que tumores malignos possuem a capacidade de invasão e metástase, é frequente o desenvolvimento de trombose associada. Assim, heparina, bem como sua forma fracionada, heparina de baixo peso molecular (LMWH), são amplamente utilizadas para a prevenção e tratamento das complicações tromboembolíticas em pacientes com câncer. As observações de pacientes nestas condições que foram submetidos ao tratamento por heparina ou LMWH mostraram uma melhora na sobrevida, sugerindo uma atividade antitumoral para estes polissacarídeos (BORSIG, 2010).

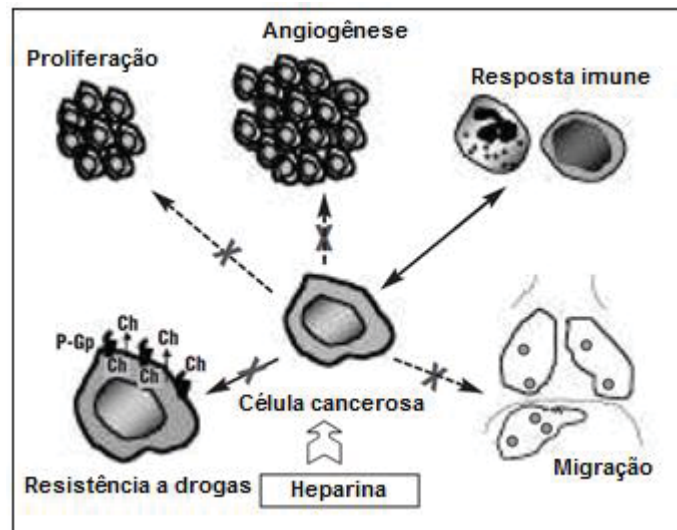
Estudos “*in vitro*” têm demonstrado que LMWH tem forte ação antitumoral, anti-proliferativa e indutora de apoptose, a qual está relacionada ao mecanismo de inibição do crescimento tumoral por esse fármaco, enquanto sua ação anticoagulante é fraca, possibilitando o uso em maiores doses deste composto (YU et al., 2010).

Desde a década de 1960 já foram realizados muitos estudos com o intuito de avaliar o potencial antitumoral de heparina. O primeiro deles foi conduzido por Wood e colaboradores em 1962, os quais utilizaram células de carcinoma de Lewis e verificaram que a heparina era capaz de diminuir metástase pulmonar (SMORENBURG; CORNELIS; NOORDEN, 2001). Outros estudos seguiram em modelos animais, e atualmente já é conhecido o potencial desses compostos de diminuir a progressão dos cânceres metastáticos de diversos tipos, como carcinoma mamário, de cólon, pulmão, bem como em melanoma (BORSIG, 2010).

No entanto, o mecanismo de ação permanece ainda desconhecido. Uma das possibilidades do modo de ação destas heparinas está na capacidade anticoagulante, uma vez que resulta na liberação do inibidor da via do fator tecidual (TFPI) do endotélio vascular, o que contribui para a atividade anti-angiogênica, diminuindo a capacidade invasiva do tumor (BORSIG, 2010). Por outro lado, as heparinas podem interagir com diversas enzimas (por exemplo, heparanase), moléculas de adesão celular e fatores de crescimento. Além disto, cabe ressaltar que a invasão das células tumorais está associada à capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, produzindo enzimas hidrolíticas, tais como metaloproteinases ou heparanase. Assim, a atividade antimetastática observada para as heparinas, pode ser causada por suas atividades biológicas, como inibição da adesão celular mediada por P e L-selectina, bem como da ação das heparanases (BORSIG, 2010).

Os possíveis mecanismos de ação de heparina sobre células tumorais foram propostos por Lecumberri, Páramo e Rocha (2005), que envolve a inibição de: a) transportador ABC (responsável pela resistência a drogas); b) capacidade proliferativa; c) migração celular; d) ativação da resposta imune (FIGURA 8).

FIGURA 8. ESQUEMA DA AÇÃO DA HEPARINA SOBRE AS CÉLULAS TUMORAIS



A atividade antitumoral da heparina é observada pela inibição do mecanismo de resistência a drogas, bem como da capacidade proliferativa, de migração e, também, pela bloqueando a angiogênese. Fonte: LECUMBERRI, PÁRAMO E ROCHA (2005).

2. JUSTIFICATIVA

Os dados da literatura mostram que os tratamentos atuais contra melanoma metastático, têm baixa eficácia, reduzindo a qualidade de vida do paciente. Sendo assim, faz-se necessário a busca pelo desenvolvimento de novas drogas capazes de tratar os pacientes com melanoma, aumentando a sobrevida e, com baixo efeito colateral. Nosso intuito é buscar mais informações sobre o mecanismo de ação de LMWH.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é estudar como Heparina é capaz de inibir o desenvolvimento de melanoma murino.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral, os animais portadores de melanoma serão tratados com heparina não fracionada ou LMWH, com os seguintes objetivos específicos:

1. Analisar se o tratamento leva à inibição do desenvolvimento tumoral;
2. Identificar o melhor composto, que possui menor dose de tratamento dos animais, para evitar efeitos colaterais;
3. Avaliar o remodelamento do ambiente extracelular que influencia no desenvolvimento do tumor;
4. Estudar a influência do tratamento sobre moléculas chaves para a progressão tumoral.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1. ANIMAIS E LINHAGEM CELULAR

Camundongos machos C57BL/6, de 8-12 semanas de idade, foram adquiridos e mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas, UFPR. Foram respeitados e seguidos todos os regimentos da Lei Nacional Nº 6.638, 5 de Novembro de 1979, para o manejo científico de animais. Todas as práticas utilizadas no presente estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEA-UFPR), sob parecer de número 687, aprovado em 2013.

Células de melanoma murino B16-F10 (ATCC: CRL-6475) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1 U/mL de penicilina, 1 µg/mL de estreptomicina. As linhagens celulares foram mantidas à 37°C em incubadora com atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

4.2. DESENVOLVIMENTO DE TUMOR SUBCUTÂNEO

Culturas de B16-F10, com 60 - 70% de confluência, foram desaderidas pela incubação por 5 minutos com 2,5 mM de tripsina em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4. A seguir, as células foram ressuspensas em DMEM livre de soro. Cerca de 5×10^5 células em 0,1ml de meio (DMEM) foram lentamente injetadas na porção subcutânea do flanco lateral da coxa direita dos camundongos em até 45 minutos após terem sido desaderidas.

4.3. TRATAMENTOS COM AS HEPARINAS

Para o tratamento dos animais, foram utilizadas Heparina não fracionada e LMWH, o tratamento com heparina foi realizado utilizando a dose de 5mg/Kg em dias alternados, a primeira aplicação no 5º dia após a injeção de células B16F10, e as demais no 8º, 11º e 14º dia, com a eutanásia dos animais ocorrendo no 17º dia após a injeção de B16F10. A exemplo do tratamento por heparina foi realizado um experimento com LMWH 5 mg/Kg com a injeção do tratamento em dias alternados. Posteriormente o tratamento com LMWH foi realizado em 2 doses sendo, 5 mg/Kg e 1 mg/Kg, em aplicações diárias conforme previamente estabelecido por Borsig e colaboradores (2010), sendo realizados cinco experimentos independentes para cada dose do tratamento, com um número total de 39 animais no lote de 5 mg/Kg, destes eram 20 animais do grupo controle e 19 que receberam LMWH. Para a dose de 1 mg/Kg foram utilizados 23 animais, sendo 12 animais para o grupo controle e 11 animais recebera esta dose de LMWH. Em ambos os casos os animais do grupo controle recebiam PBS, o diluente de LMWH. Os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal, sendo iniciado no 6º dia após a inoculação das células, sendo tratados diariamente até o 14º dia. A eutanásia dos animais ocorreu no décimo quinto dia, por deslocamento cervical após o procedimento de anestesia, conforme aprovado pelo comitê de ética (CEUA/SCB-UFPR 687).

4.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os tumores sólidos foram fixados em Paraformaldeído 4%, em PBS, pH 7,4, por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em Xilol e incluídas em parafina. Cortes de 3µm dos tumores foram depositados em lâminas carregada positivamente (Immunoslide, Easypath®). Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol, e processados para a imunohistoquímica. Cortes reidratados foram incubados com 3% H₂O₂ em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato de Sódio 10 mM, pH 6.0, à 95° C, por 40 minutos. Possíveis ligações não específicas, bem como radicais aldeídicos livres foram bloqueados pela incubação de 5 minutos com PBS contendo 1% de BSA e por PBS contendo 0,1M de Glicina, respectivamente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 12 horas à 4°C com os anticorpos primários. Os anticorpos primários utilizados e suas diluições foram: anti-KI67 (Biocare CRM325, IgG de coelho, diluído 1:200), anti-CD44 (BD Pharmigen 550538, IgG de rato, diluído 1:100), VEGF (BioSB BSB6085, IgG de coelho, diluído 1:100), anti-Condroitim Sulfato (Millipore MAB 1581, diluído 1:50), Caspase-3 (Biocare Medical CP229, IgG de Coelho, diluído 1:100), Sindecam-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC7100, IgG de camundongo, diluído 1:100), Glipicam-1 (Santa Cruz SC48517, IgG de camundongo, diluído 1:80), MMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC53630, IgG de camundongo, diluído 1:200), MMP-9 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC6840, IgG de cabra, diluído 1:200) Sindecam-2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC15348, IgG de coelho, diluído 1:100), Sindecam-4 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC15350, IgG de coelho, diluído 1:100), RECK-1 (CellSignaling, 3433, IgG de coelho diluído 1:100), HRF (TCTP) (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC 30124, IgG de coelho, diluído 1:100), bem como com a proteína de ligação ao ácido hialurônico diluído 1:80, conjugada com biotina por 1 hora em temperatura ambiente (cedida pela Prof. Helena Nader – UNIFESP). Após o término do tempo de incubação, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários específicos (exceto a proteína de ligação, pois já é biotinilada e nesse caso foi incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos). Os anticorpos secundários utilizados foram incubados por 30 minutos em

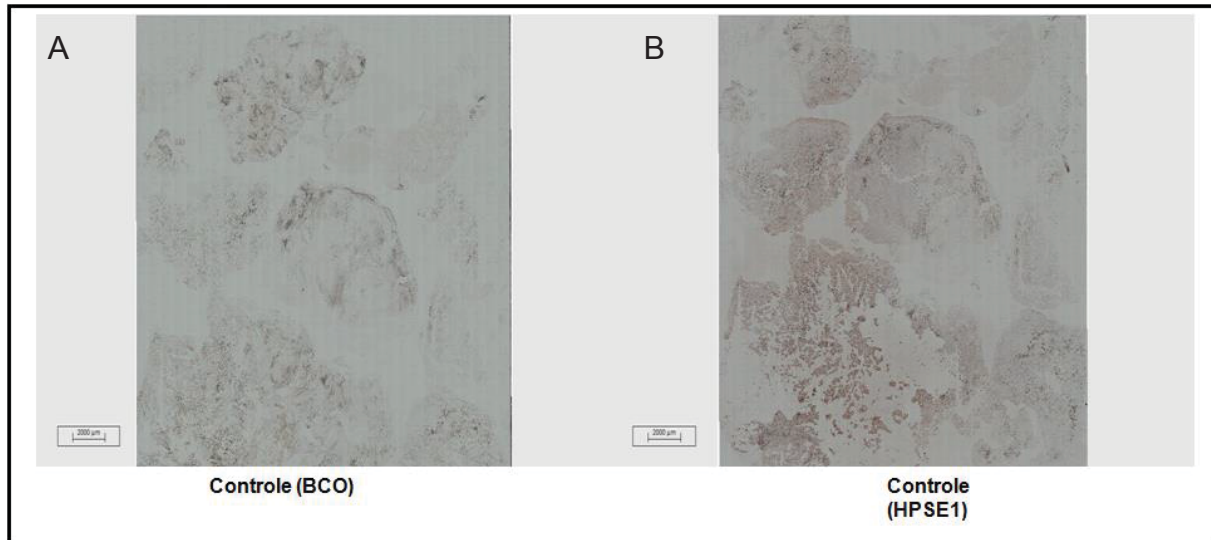
temperatura ambiente, sendo eles: anticorpo secundário biotinilado de coelho contra IgG de cabra (Vector Laboratories, BA-500, diluído 1:200), anticorpo secundário biotinilado de cabra contra IgG de rato (Vector Laboratories, BA-9400, diluído 1:300) anticorpo secundário biotinilado de cabra contra IgG de coelho (Vector Laboratories, BA-1000, diluído 1:300), anticorpo secundário biotinilado de cabra contra IgG de camundongo (Vector Laboratories, BA-9200, diluído 1:300), após a incubação com os respectivos anticorpos secundários foi realizada a incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos. A revelação da ligação dos anticorpos primários foi realizada com DAB (“3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride”) (DAB substrate Kit, BD Pharmigen). A seguir, os cortes foram desidratados em bateria crescente de etanol. Após incubação em xilol, as lâminas permanentes foram montadas com Entellan (Merck®).

As lâminas foram submetidas tanto às colorações, quanto a ensaio de imunohistoquímica foram analisadas e fotografadas utilizando “Scanner” de Lâminas Histológicas (modelo Vslider, da Carl Zeiss em parceria com a Metasystems).

Para quantificação de marcação por DAB, utilizou-se o software imageJ (NIH), utilizando lâminas marcadas ou imunomarcadas e reveladas com DAB, mas sem a contra coloração. Foram produzidas também lâminas sem qualquer marcação, apenas com os tumores e sua pigmentação de melanina, que foram aqui definidos como branco (BCO), utilizando assim o mesmo valor de threshold para o controle e o tratamento, foram realizadas as quantificações de intensidade por área tumoral. Com isso foi possível descartar a quantidade de melanina com o uso do software, então as demais marcações foram quantificadas reduzindo o valor da melanina. Para tanto, as imagens das lâminas foram pareadas primeiramente com sua respectiva imagem da lâmina em branco, sendo a seguir descontado o valor da melanina do branco (FIGURA 9A). Outro fator que foi considerado para fazer as quantificações da marcação foi a área tumoral. Tendo em vista que o tratamento reduzia a área tumoral, a área do tumor (controle ou tratado) na lâmina foi determinada pela quantificação da área total ocupada, dos cortes corados com Hematoxilina e Eosina. Assim, foi calculado o percentual de marcação em relação à área tumoral (FIGURA 9B). Esse processo foi realizado em todos os tumores avaliados, tanto nos controles (20 tumores) quanto no

grupo de tratamento (19 tumores). Com avaliação total dos cortes obtidos, para obtenção de uma análise quantitativa das amostras.

FIGURA 9. PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DAS MARCAÇÕES OBTIDAS



Lâminas histológicas, com ou sem marcação (Branco – BCO) foram submetidas à coleta das imagens utilizando “Scanner” lâminas histológicas. As imagens obtidas foram quantificadas no software Image J, sendo que a quantificação obtida para o branco correspondente foi descontada daquela obtida para as lâminas marcadas com DAB. FONTE: O Autor (2014).

4.5. TESTES ESTATÍSTICOS

No presente trabalho foram realizados dois testes estatísticos, o teste de variância de uma via ANOVA (One-way) para avaliar o crescimento final dos tumores tratados em relação ao controle e Unpaired *t* test para comparar a quantidade de marcação.

5. RESULTADOS

5.1. PADRONIZAÇÃO DO TIPO DE HEPARINA E DOSE UTILIZADA PARA TRATAMENTO

5.1.1 Heparina não fracionada leva ao sangramento no animal

O primeiro passo do estudo foi escolher entre heparina não fracionada e LMWH, avaliando qual desses fármacos é mais eficiente no tratamento dos animais portadores de melanoma e/ou que apresentasse ausência de hemorragia, o principal efeito colateral desse tipo de fármaco.

Inicialmente os animais foram tratados com heparina não fracionada. Para tanto, no 5º dia após a inoculação com as células tumorais os animais foram tratados com heparina (5 mg/kg), sendo que a administração foi realizada em dias intercalados, com intervalos de 3 dias, seguindo até o 17º dia (foram realizadas injeção intraperitoneal de heparina com 5, 8, 11 e 14 dias após a inoculação das células). Os resultados mostraram que os dez animais que foram tratados com heparina não fracionada exibiram sangramento cutâneo, e não sobreviveram até o final do tratamento, sendo dez dias o máximo de sobrevivência com utilização do tratamento por heparina não fracionada (resultados não mostrados).

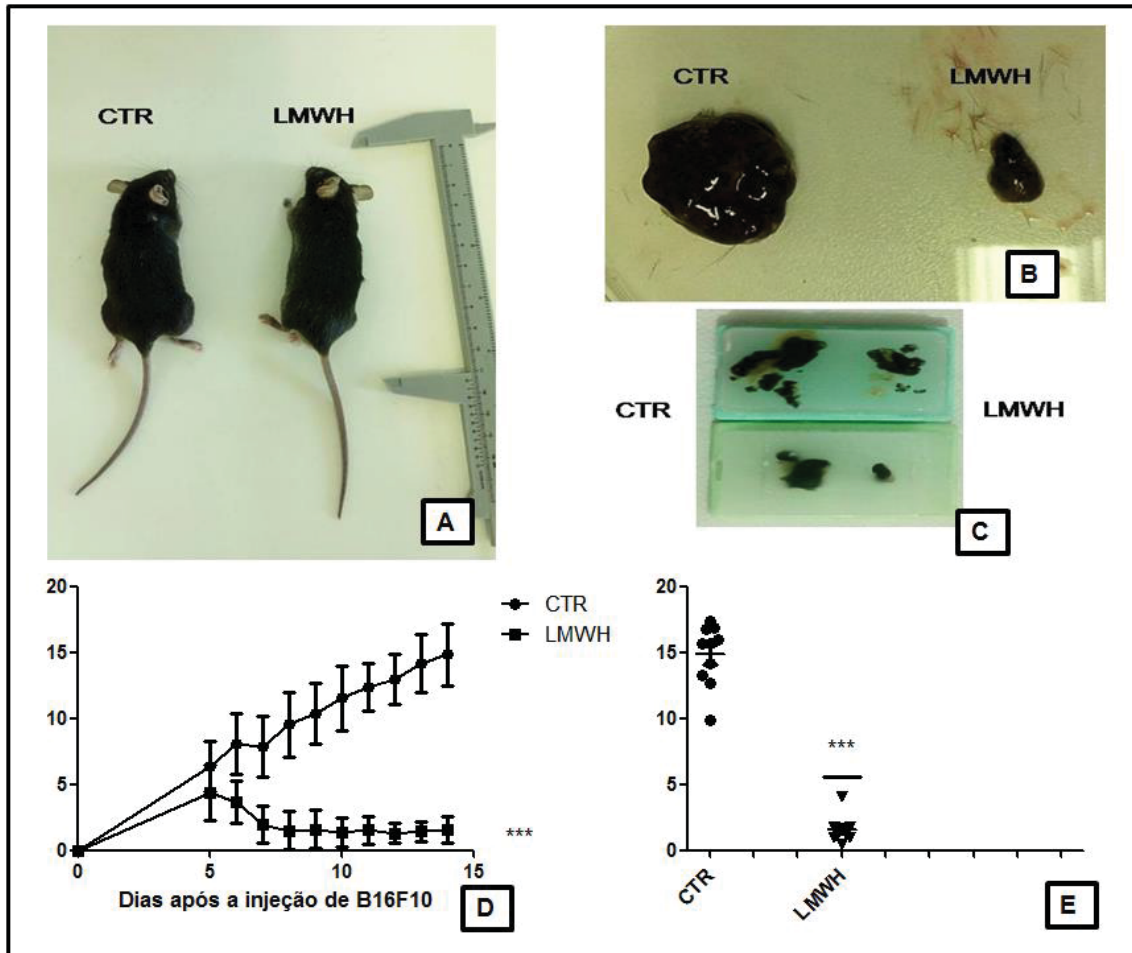
5.1.2. O tratamento com LMWH leva à diminuição do tamanho do tumoral

O próximo passo foi avaliar se LMWH poderia reduzir o desenvolvimento tumoral. Os resultados iniciais mostraram que o tratamento com LMWH, na dose de 5mg/kg levou a uma pequena redução do tamanho do tumor, mas não levou a sangramentos, como observado na heparina não fracionada (dados não mostrados).

Tendo em vista que LMWH pode reduzir minimamente o tamanho do tumor e, por outro lado, os animais não demonstraram hemorragia cutânea, foram realizadas alterações do protocolo experimental, que consistiram no início do tratamento no 6º dia, e também seguiu com injeções diárias, até o 14º dia. Os resultados mostram claramente que os tumores dos animais tratados com LMWH apresentam tamanho

cerca de 70% menor que aqueles desenvolvidos nos animais do grupo controle (tratados somente com PBS) (FIGURA 10).

FIGURA 10. LMWH LEVA A DIMINUIÇÃO DO TAMANHO DO TUMOR

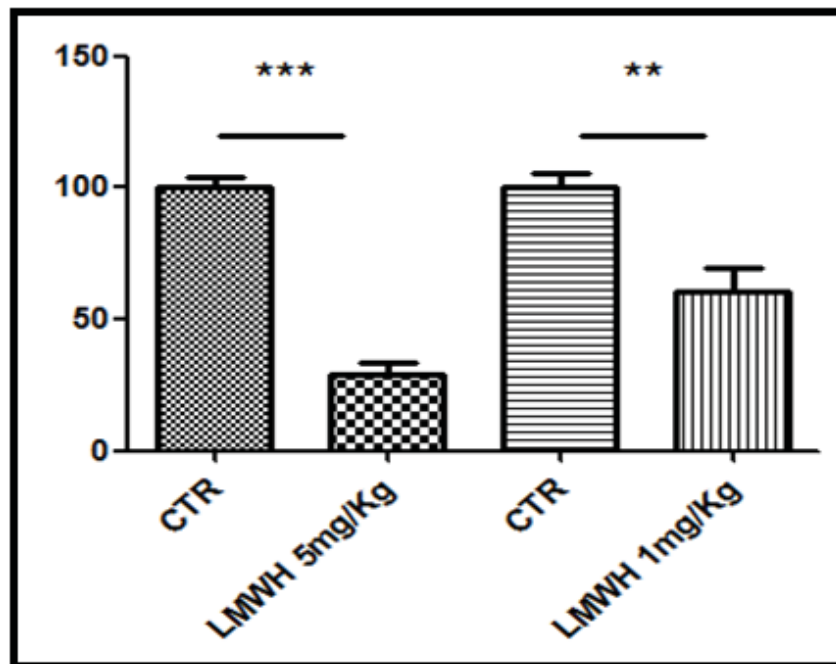


Os animais foram inoculados com células B16-F10 (5×10^5 células em $100 \mu\text{l}$). Após 5 dias da inoculação, os animais foram tratados com LMWH 5mg/Kg ou apenas com seu veículo (CTR), uma vez por dia, até o 14º dia, conforme descrito em Material e Métodos. A Figura acima mostra uma fotografia obtida dos animais (A), evidenciando o tumor no flanco direito do animal, bem como os tumores retirados após eutanásia, que estão ilustrados em (B). Já os blocos histológicos, contendo tanto o tumor do grupo controle, quanto do grupo tratado com LMWH, são mostrados em C. Assim, a mesma lâmina histológica continha os cortes do grupo controle e tratado. O gráfico comparativo do crescimento tumoral em cm^3 entre os grupos podem ser observados em D, e o gráfico da curva de crescimento é observado em E. Observe que os animais do grupo tratado com LMWH tiveram um menor volume tumoral, quando comparados como os do grupo controle. $p \leq 0,0001$. FONTE: O Autor (2014).

O próximo passo foi avaliar se a diminuição da dose poderia também levar a uma redução significativa no tamanho do tumor. Os dados comparativos entre os dois tratamentos estão representados na FIGURA 11, é possível verificar que o tratamento com 1mg/kg levou a diminuição significativa do desenvolvimento do tumor, sendo ao

redor de 30%. No entanto, quando esse resultado é comparado com o tratamento com 5mg/kg, pode-se verificar que esse é muito mais eficiente que 1mg/kg, pois levou a uma redução de aproximadamente 70%.

FIGURA 11. LMWH 5 mg/Kg e LMWH 1mg/Kg LEVAM A REDUÇÃO DO VOLUME TUMORAL



Os camundongos C57BL6 foram inoculados com 5×10^5 células no flanco direito. Após 5 dias de desenvolvimento tumoral foram iniciados os tratamentos com LMWH 5 mg/Kg ou 1 mg/Kg, que seguiram diariamente, até o 14º dia. No 15º dia foi realizada a eutanásia para obtenção dos tumores sólidos. A Figura acima mostra em porcentagem em relação ao controle, a diferença entre o volume médio dos tumores sólidos, quando submetidos ao tratamento com LMWH, na dose de 5mg/Kg. $p \leq 0,0001$, enquanto na dose de 1mg/Kg. $p \leq 0,0015$. FONTE: O Autor (2014).

Desta forma, como observado nas Figuras 8 e 9, o tratamento com LMWH claramente reduz o tamanho dos tumores sólidos, sendo 5 mg/Kg a dose eleita, que foi adotada para as próximas análises.

Assim, o próximo passo foi investigar a massa tumoral para entender o que o tratamento está fazendo para causar esse efeito. Para tanto, os tumores foram fixados, processados para histologia e, então, foram obtidos os cortes histológicos nos quais foram realizados ensaios de imunomarcagem.

5.2. TUMORES DE ANIMAIS TRATADOS COM LMWH POSSUEM MAIORES ÁREAS DE NECROSE

A primeira análise que foi realizada utilizou a coloração panocítica de HE (Hematoxilina/Eosina), a qual evidencia núcleos em cor azul e citoplasma em coloração rosa (FIGURA 12). Nesta análise é possível verificar que as estruturas teciduais permaneceram bem preservadas. Fica evidente que o tratamento com LMWH mostra áreas com necrose do tumor, evidenciadas pela seta. Ainda, é possível verificar que o grupo tratado com LMWH possui menos vasos sanguíneos (cabeça de seta), quando comparados com o grupo controle.

FIGURA 12. ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS TUMORES SÓLIDOS

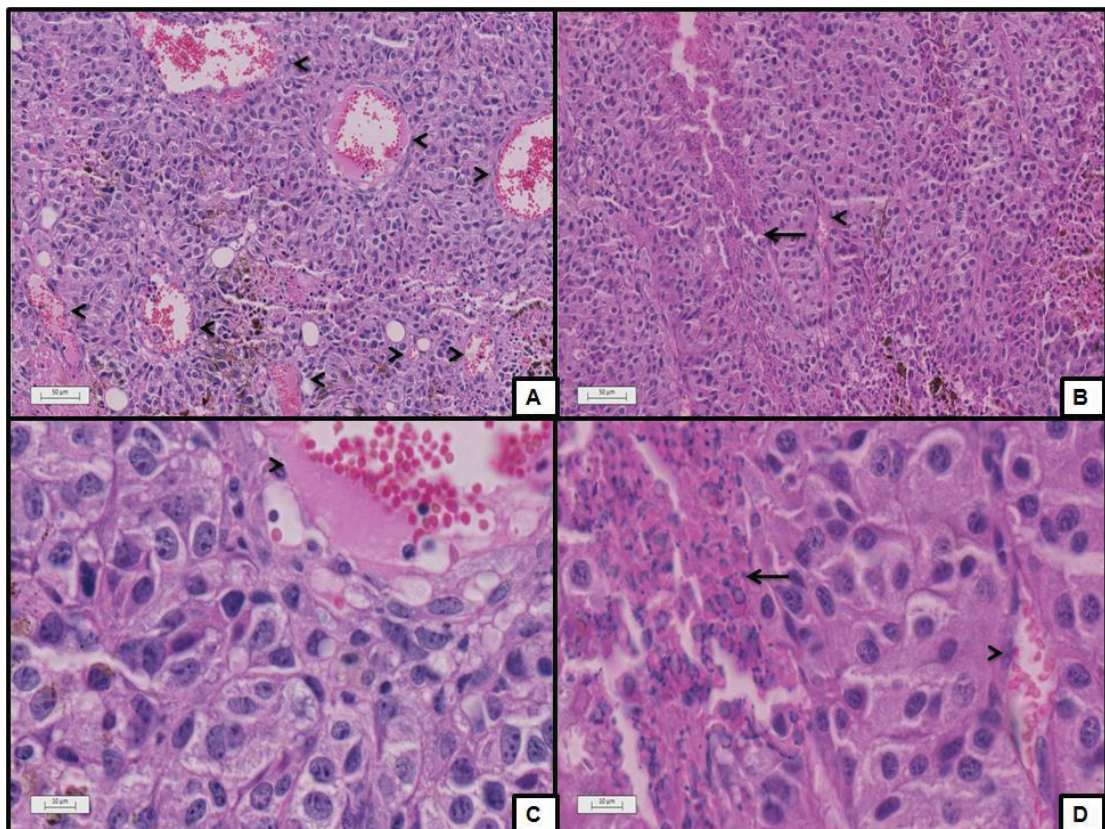
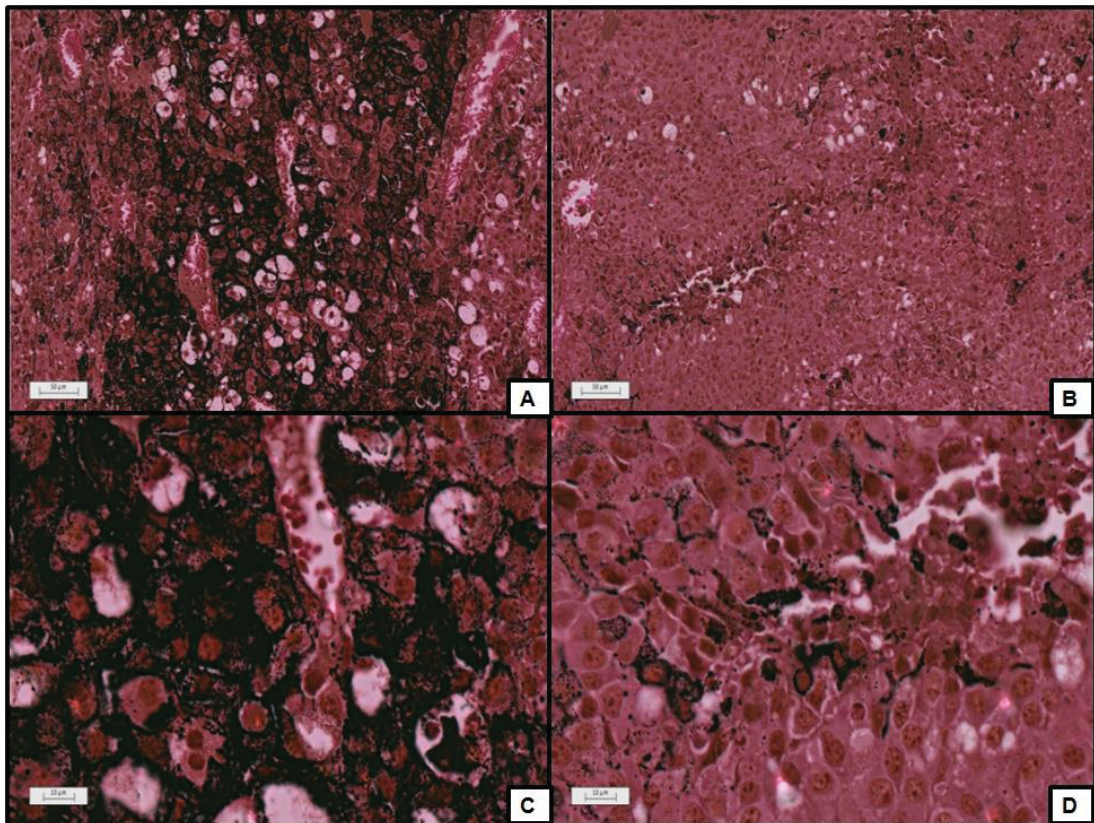


Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle A, C) com LMWH (B e D) que foram corados por HE. Note que há maior quantidade de áreas de necrose (setas) no grupo LMWH, quando comparado com o grupo tratado com controle, que possui maior quantidade de vasos (cabeças de seta). O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. FONTE: O Autor (2014).

5.3. TUMORES DE ANIMAIS TRATADOS COM LMWH POSSUEM MENOS MELANINA

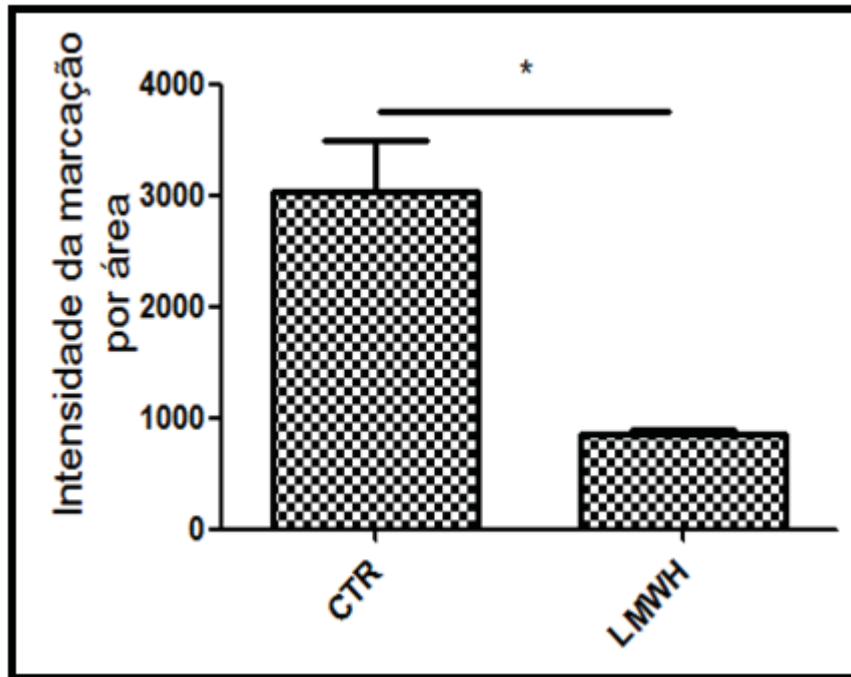
Então, para confirmar a presença de melanina, foi utilizada a técnica de Fontana Masson, a qual é amplamente empregada para detectar a presença desse pigmento em estudos histológicos, ressaltando-a em preto, pela reação com nitrato de prata. Na análise histológica de Fontana Masson fica evidente que no grupo tratado com LMWH há realmente menos melanina, se comparado ao grupo controle. Quando foi quantificada a intensidade de marcação para melanina fica confirmado que, realmente há menor quantidade de melanina no grupo tratado com LMWH (FIGURA 13).

FIGURA 13. LMWH REDUZ A QUANTIDADE DE MELANINA EM MELANOMA MURINO



A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle A, C) com LMWH (B e D), submetidos à coloração de Fontana Masson para identificar melanina produzida pelos tumores. O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 µm e inferior = 10 µm. FONTE: O Autor (2014).

FIGURA 14. LMWH REDUZ A QUANTIDADE DE MELANINA EM MELANOMA MURINO



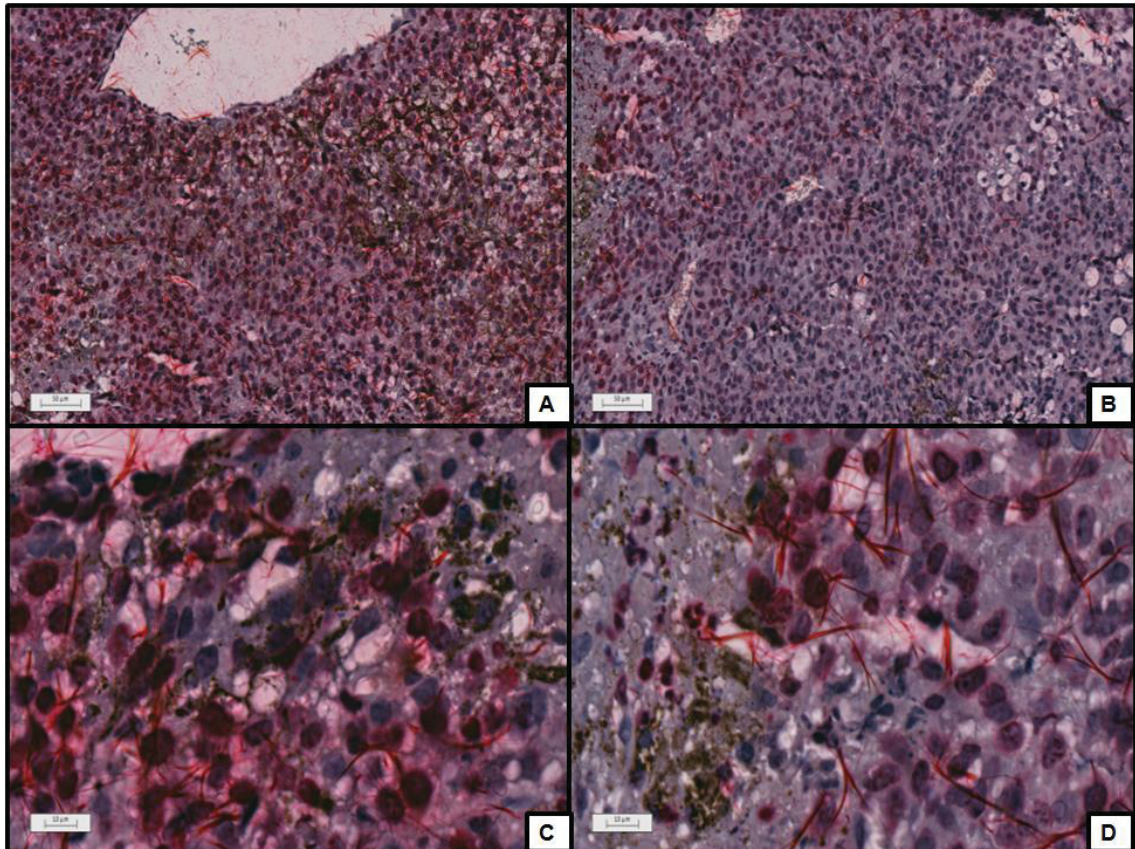
O gráfico acima mostra a redução na quantidade de melanina das células tumorais nos animais submetidos ao tratamento com LMWH 5mg/Kg em relação ao grupo controle. A quantificação foi realizada, em relação intensidade da marcação na área tumoral, tendo em vista que os tamanhos dos tumores são bem diferentes entre os dois grupos. FONTE: O Autor (2014).

5.4. O TRATAMENTO COM LMWH LEVA A MENOR PROLIFERAÇÃO CELULAR E AUMENTO DA APOPTOSE

Os tumores de melanoma, além de expressar melanina, também têm como característica o alto índice proliferativo. Para verificar se o tratamento com LMWH poderia alterar a taxa de proliferação das células tumorais, utilizou-se a marcação por imunohistoquímica com anticorpo para KI67, que é um antígeno nuclear associado à proliferação celular. Nesse caso, a detecção da reação foi realizada com “fastred”, o qual marca em vermelho, sendo que os núcleos das células foram contra-corados com hematoxilina, que cora em azul. Assim, células que estão em divisão celular, apresentam KI67 e, portanto, são coradas em vermelho, mas são observadas em roxo/lilás, decorrente da sobreposição do vermelho, proveniente da marcação positiva do anticorpo (revelado com “fastred”) e do azul, proveniente da coloração com hematoxilina. Os resultados mostram que a proliferação celular é bastante reduzida

quando os animais são tratados com LMWH, em comparação aos animais do grupo controle (FIGURA 15). Vale salientar que no grupo LMWH também apresenta marcação para KI67, mas em menor proporção.

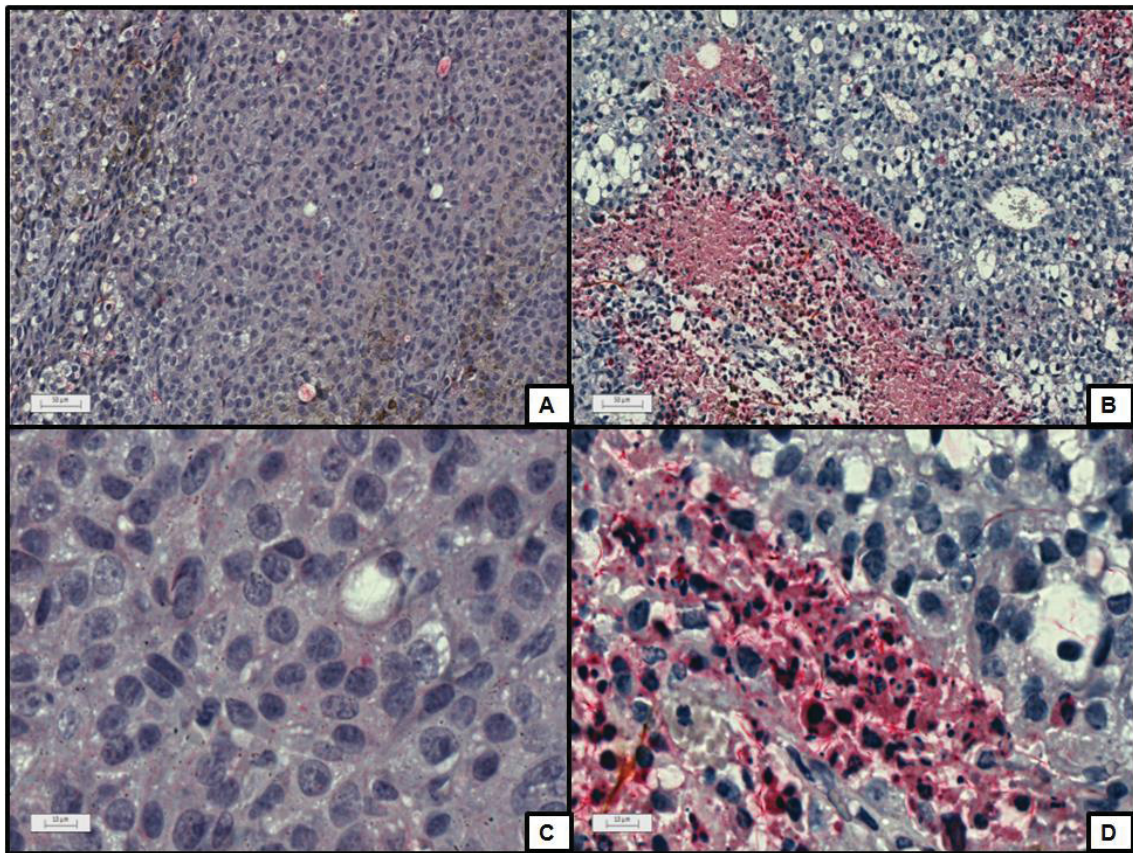
FIGURA 15. TRATAMENTO POR LMWH LEVA A REDUÇÃO NA PROLIFERAÇÃO DE B16-F10



A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle – A e C) com LMWH (B e D) submetidos à imunomarcação para KI67, uma molécula que está presente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não está presente em G0 e, desta forma, revela células em proliferação. Técnica revelada com anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina, com revelação com “fastred” (vermelho) e contra-coloração para o núcleo com hematoxilina (azul). Observe que os locais de marcação positiva para KI67 estão em roxo, decorrente da sobreposição do vermelho (positivo para KI67) e do azul (hematoxilina). O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escaner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 μ m e inferior = 10 μ m. FONTE: O Autor (2014).

Utilizando um anticorpo que reconhece caspase-3 na sua forma ativa, por ensaios de imunohistoquímica e revelação com fosfatase alcalina “fastred”, foi possível verificar que no grupo tratado com LMWH há maior número de células positivas para esta proteína, sugerindo que estão em processo apoptótico (FIGURA 16), quando comparado ao grupo controle.

FIGURA 16. LMWH AUMENTA A EXPRESÃO DE CASPASE-3 EM MELANOMA



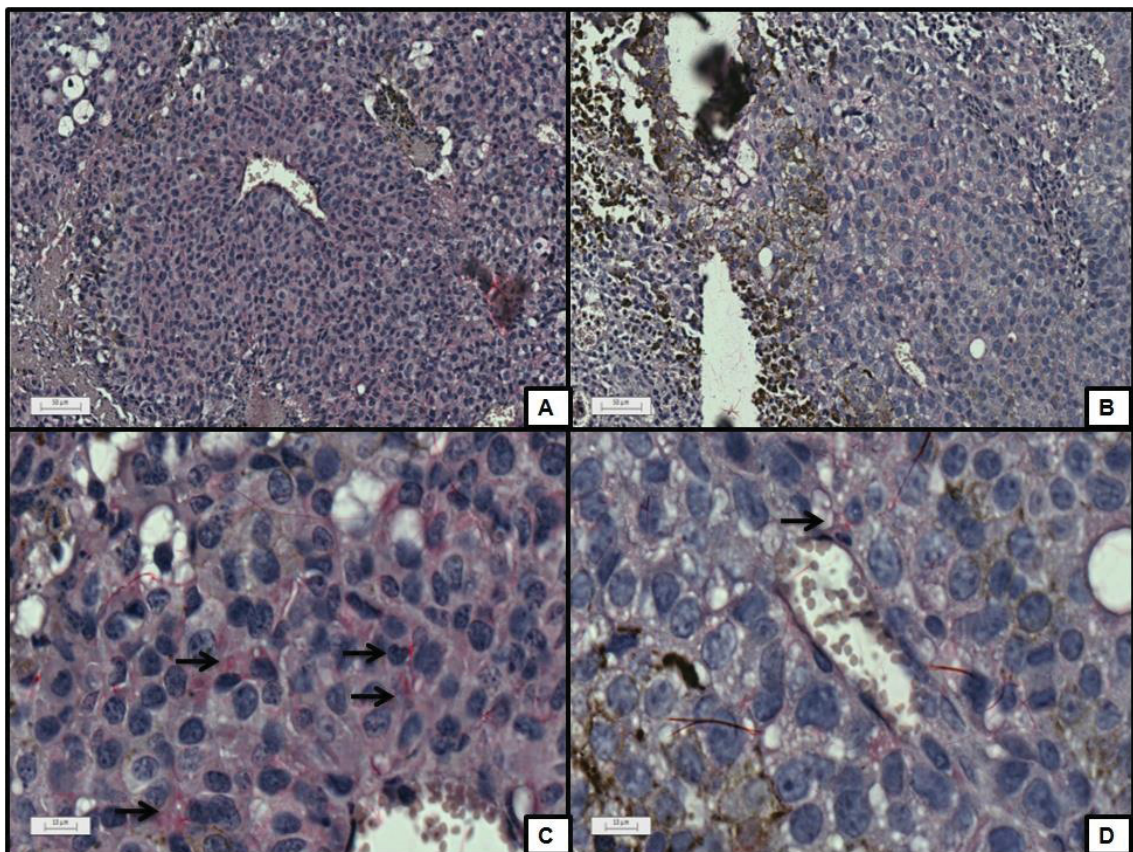
A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle – A e C) com LMWH (B e D), submetidos à imunomarcagem para Caspase-3 ativa, revelada com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina e coloração com “fastred”, mostrando células que podem estar em processo de apoptose. Note que praticamente não há marcação positiva no grupo controle, mas há muitas regiões marcadas para caspase-3 no grupo tratado com LMWH, sugerindo apoptose. O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 μ m e inferior = 10 μ m. FONTE: O Autor (2014).

5.4.1. O efeito do tratamento com LMWH sobre a angiogênese

O melanoma, como tumores metastáticos, também tem por característica estimular a formação de vasos peritumorais para melhorar o suprimento das células tumorais e facilitar as metástases. Assim, faz-se necessário investigar fatores angiogênicos, que estimulam o crescimento tumoral, o que poderia responder o porquê das alterações no tamanho do tumor, na proliferação celular e atividade apoptótica, como observado anteriormente. Inicialmente foi avaliado o VEGF (fator de crescimento vaso-endotelial), tendo em vista que o aumento da produção dessa molécula tem uma relação direta com a maior formação de novos vasos e,

consequentemente, com a sobrevivência tumoral (CHAO *et al*, 2013). A reação de imunomarcagem nos cortes histológicos para evidenciar a presença de VEGF foi realizada utilizando anticorpo anti-VEGF, seguida de revelação por “fastred” e com contra-coloração por hematoxilina. Os resultados estão ilustrados na FIGURA 17, onde pode-se observar que as amostras tratadas por LMWH mostram redução da expressão de VEGF em relação ao controle. Esse resultado sugere que ocorre uma menor formação de vasos nos tumores dos animais tratados com LMWH, mas deve ser avaliado outros marcadores para angiogênese para confirmar esses resultados.

FIGURA 17. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE VEGF EM MELANOMA MURINO

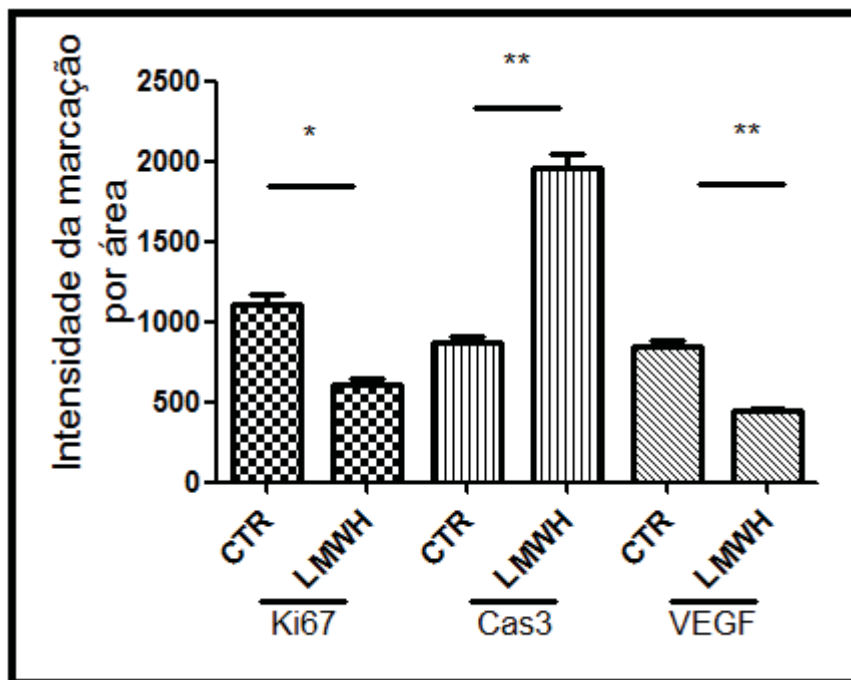


A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle A, C) com LMWH (B e D), submetidos à imunomarcagem para VEGF. As setas evidenciam marcação positiva da ligação do anticorpo anti-VEGF, nas células onde está sendo expresso o fator de crescimento vaso endotelial revelada em vermelho por “fastred”. O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 μ m e inferior = 10 μ m. FONTE: O Autor (2014)

5.4.2. A redução da angiogênese e suas consequências

Como foi demonstrado anteriormente, as imagens mostram claramente as alterações em proliferação celular e apoptose do tumor após o tratamento, verificadas pela imunomarcagem de KI67 e caspase3 respectivamente e, esses fatores podem ser decorrentes da menor formação de vasos. Com a quantificação dessas marcações é possível afirmar que a proliferação celular, foi reduzida pela LMWH em aproximadamente 45%, enquanto a apoptose (observada por caspase-3) demonstrou um valor aproximadamente 2 vezes maior que controle. O tratamento com LMWH mostrou que os animais tratados exibem uma redução de aproximadamente 46% no VEGF, em relação ao controle (FIGURA 18).

FIGURA 18. LMWH 5mg/Kg LEVA A REDUÇÃO NA PROLIFERAÇÃO, EXPRESSÃO DE VEGF E AUMENTA A MORTE CELULAR

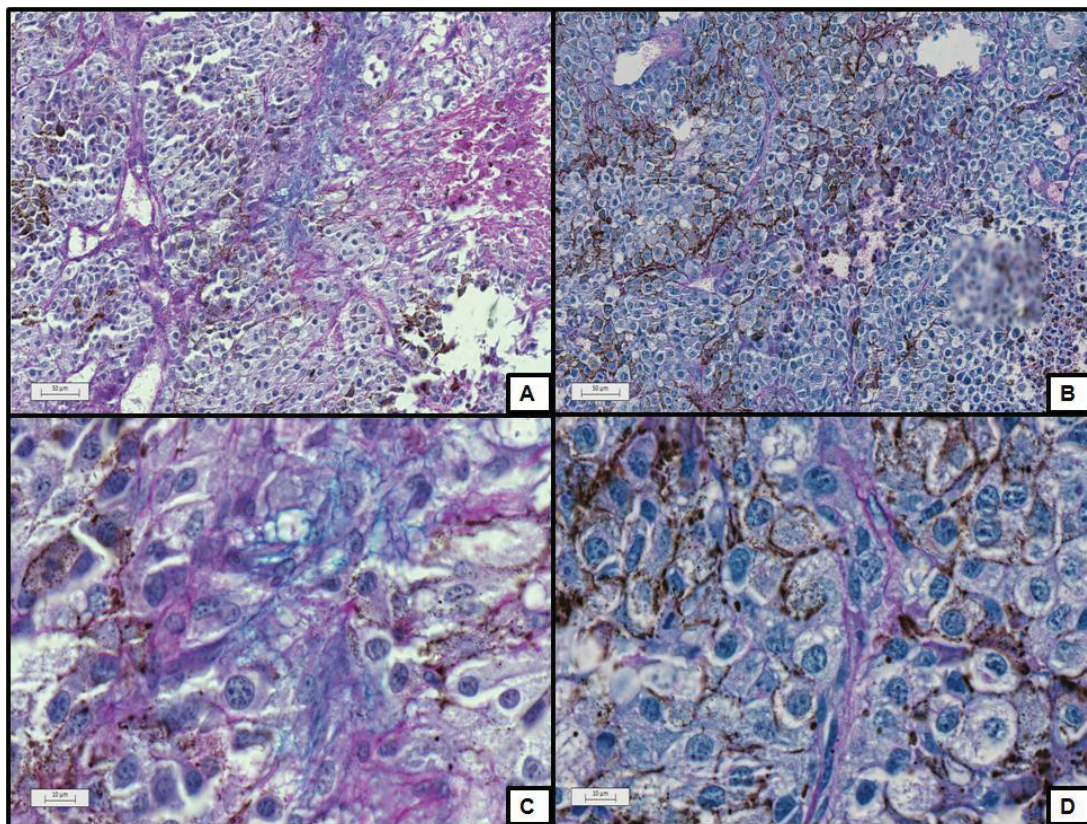


5.5. O TRATAMENTO COM LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS, ÁCIDO HIALURÔNICO E PGCS

Glicoconjugados desenvolvem papel crucial em processos de proliferação, angiogênese, desenvolvimento e sobrevivência tumoral. A partir dos resultados que foram obtidos nos experimentos anteriores, levou a verificar se os glicoconjugados pudessem estar sendo alterados. Para tanto, inicialmente foi necessário ter um panorama geral a respeito da presença de carboidratos totais nas secções histológicas.

A investigação dos carboidratos gerais presente nos cortes histológicos foi realizada utilizando coloração de PAS. Os carboidratos marcados pela reação de Schiff adquiriam coloração rosea, e revelou que no grupo tratado houve menor quantidade de carboidratos em relação ao controle (FIGURA 19).

FIGURA 19. LMWH REDUZ A QUANTIDADE DE CARBOIDRATOS TOTAIS EM MELANOMA

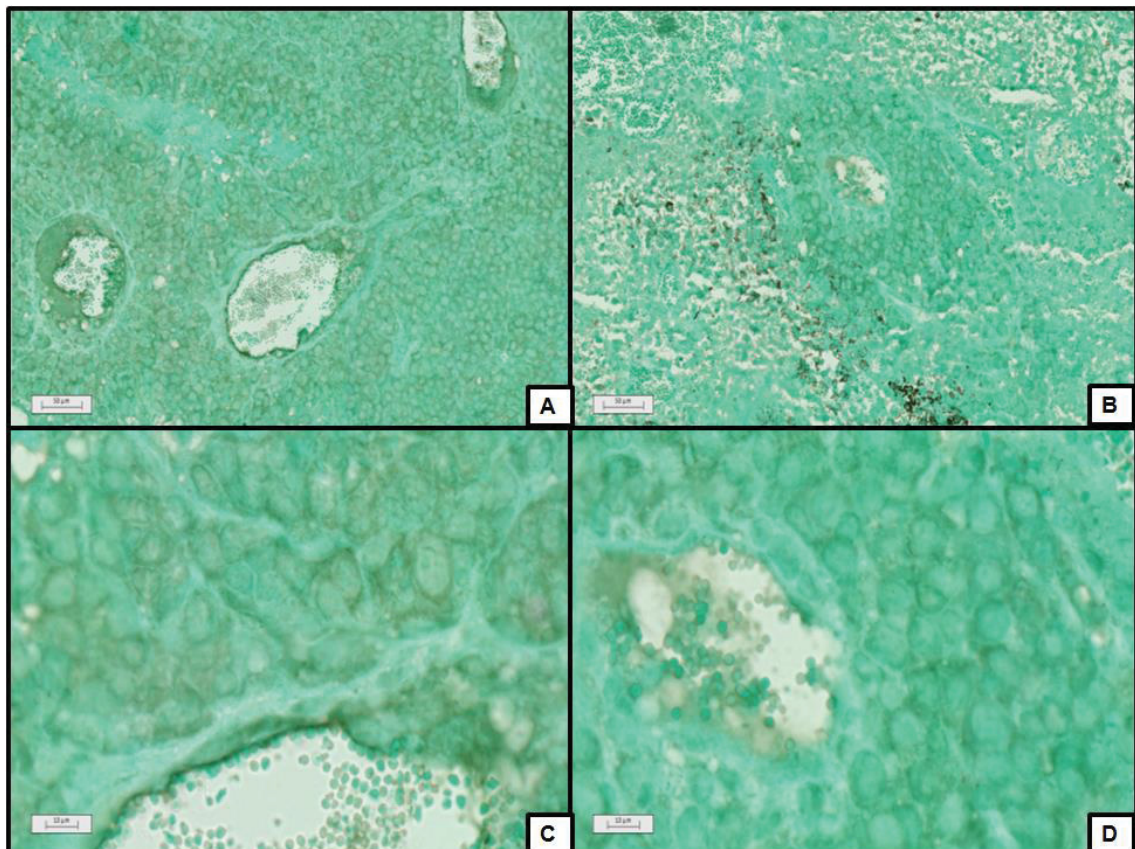


A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle – A e C) com LMWH (B e D), submetidos à coloração com PAS para evidenciar a quantidade e distribuição de carboidratos nos tecidos. Note que há muito mais marcação

com PAS (em roxo) no grupo controle, que no grupo tratado com LMWH, sugerindo que o tratamento leva a uma menor quantidade de carboidratos totais. O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 µm e inferior = 10 µm. FONTE: O Autor (2014).

O próximo passo foi avaliar o Ácido hialurônico, um glicosaminoglicanos característico da matriz extracelular (FJELDSTAD, 2005). Utilizando um “probe” (proteína de ligação ao Ácido Hialurônico, conjugada com biotina), que foi revelado pela reação de estreptavidina peroxidase e DAB e, ainda, com contra coloração por “fast green”. Foi verificado que nas amostras dos tumores do grupo controle havia maior marcação de Ácido Hialurônico, quando comparado ao grupo tratado com LMWH (FIGURA 20).

FIGURA 20. LMWH LEVA A REDUÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁCIDO HILURÔNICO

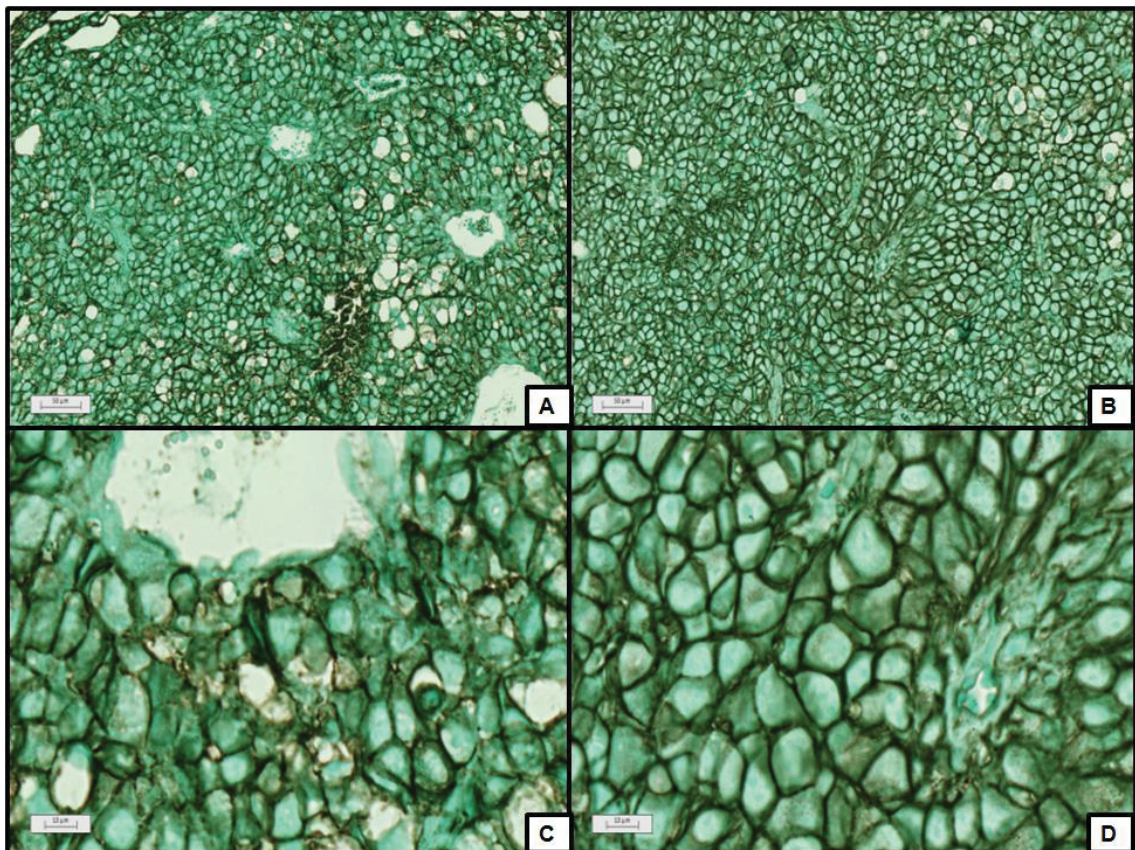


A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle A, C) com LMWH (B e D), submetidos a ensaio de histoquímica para detecção de ácido hialurônico, que foi revelado pela reação com peroxidase-DAB, marcando em castanho/marrom, note que há marcação no grupo controle (A e C), mas está ausente no grupo tratado com LMWH (B e D). Os painéis inferiores são ampliações das respectivas imagens superiores, que foi

obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 µm e inferior = 10 µm. FONTE: O Autor (2014).

Como houve menor marcação para ácido hialurônico, o passo seguinte foi a investigação do que ocorre com o seu receptor, o CD44. Vale salientar que trata-se de uma proteína transmembrana e é superexpressa pelas células de melanoma, e que, embora não seja exclusiva do melanoma, essa molécula está associada ao prognóstico ruim, por ser um marcador de malignidade (TOOLE, 2002). Utilizando imunohistoquímica com revelação pela reação de peroxidase-DAB e contra-coloração com “Fast Green”, pode-se observar a marcação de CD44 em marrom, na membrana das células que são positivas para a reação e revelou que o tratamento com LMWH não altera a expressão desse receptor, quando comparado com o grupo controle (FIGURA 21).

FIGURA 21. A EXPRESSÃO DE CD44 NÃO É ALTERADA PELO TRATAMENTO COM LMWH

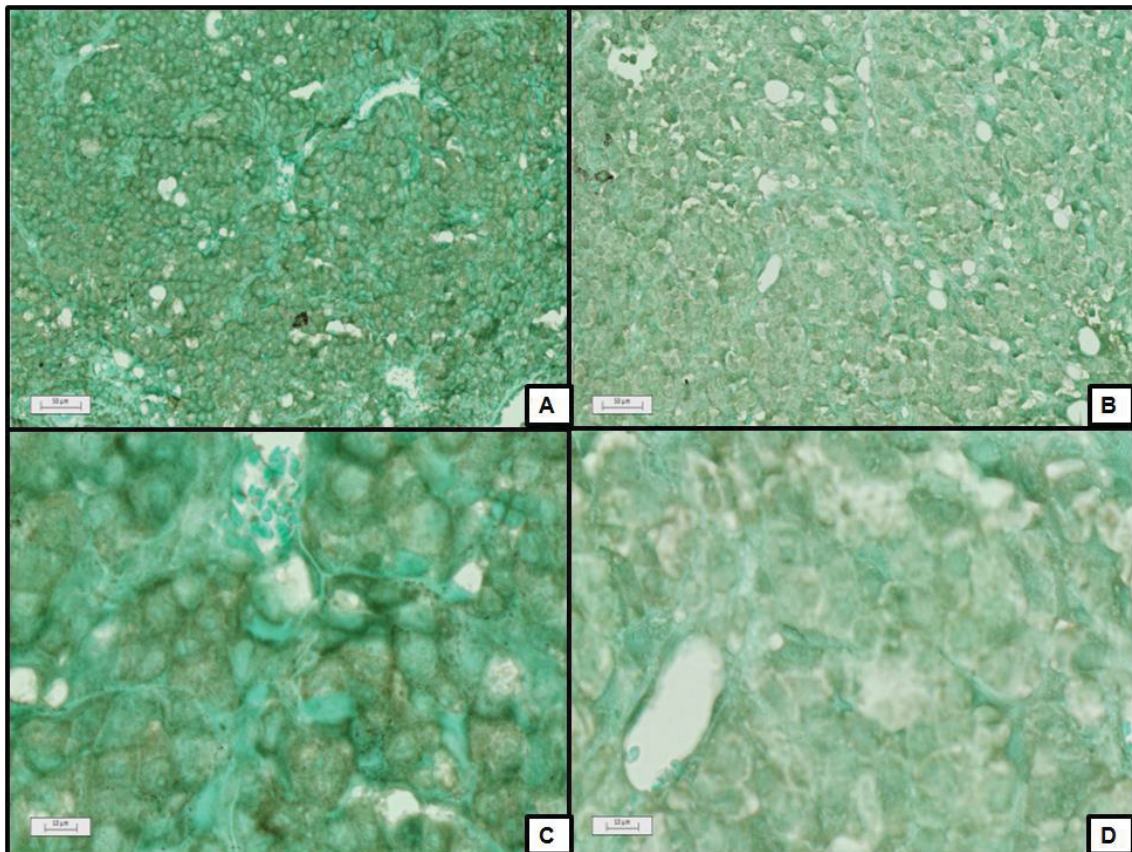


A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle – A e C) com LMWH (B e D), submetidos a reação de imunomarcagem para detecção de CD44, com posterior revelação pela reação de peroxidase-DAB. Observe a marcação positiva para CD44, revelada em castanho/marrom. O painel inferior é uma ampliação da imagem

superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 µm e inferior = 10 µm. FONTE: O Autor (2014).

O proteoglicano de condroitim sulfato (PGCS) que é superexpresso no melanoma, desempenha papel importante na progressão tumoral, pois sua clivagem libera fragmentos que são importantes fatores de crescimento. Assim, buscou-se também avaliar se o tratamento com LMWH poderia alterar a quantidade desse proteoglicano. Os resultados mostram que há uma redução na intensidade de marcação desse proteoglicano nos cortes histológicos dos animais tratados com LMWH, em relação ao controle (FIGURA 22).

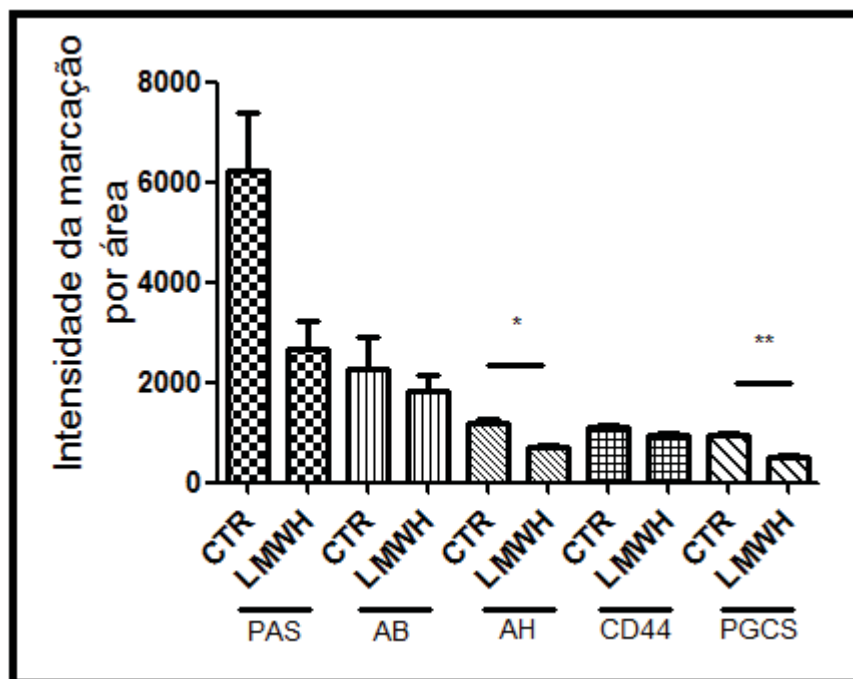
FIGURA 22. PROTEOGLICANO DE CONDROTIM SULFATO É REDUZIDO PELO TRATAMENTO COM LMWH



A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle - A e C) com LMWH (B e D), submetidos à reação de imunomarcção para detecção de PGCS, com posterior revelação pelo complexo peroxidase/DAB (castanho/marrom). Observe que o tratamento com LMWH (B e D) mostra uma menor intensidade da marcação de PGCS, quando comparado ao grupo controle (A e B). O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 µm e inferior = 10 µm. FONTE: O Autor (2014).

A FIGURA 23 mostra a quantificação das marcações para glicoconjugados e revela que o tratamento com LMWH mostra ter grande efetividade na redução desses compostos, tão importantes para a progressão tumoral. Observe que dentre os compostos avaliados destaca-se a redução em aproximadamente 40% em AH e de 46% em PGCS, moléculas intimamente envolvidas no processo tumoral do melanoma.

FIGURA 23. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS, ÁCIDO HIALURÔNICO E PGCS



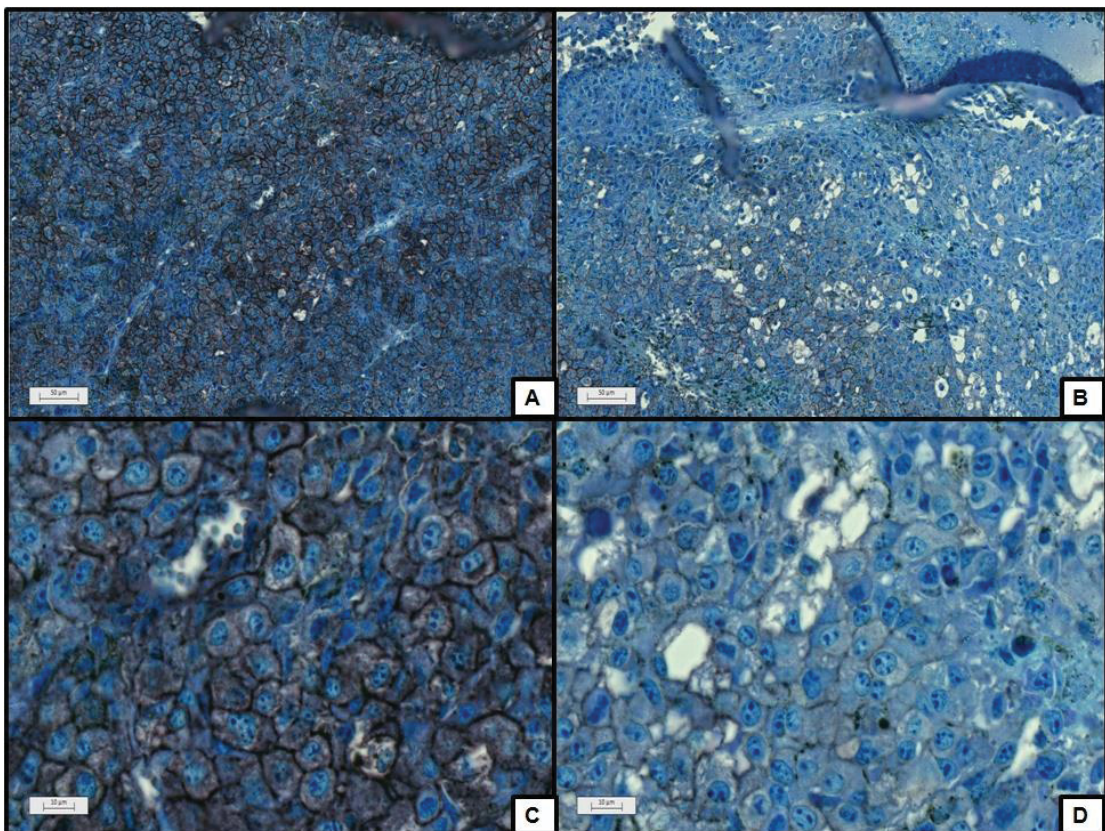
Lâminas contendo cortes histológicas de tumores sólidos, tanto de animais do grupo controle, quanto tratados, foram processados por coloração de ácido periódico e schiff (PAS) e Alcian blue (AB), também foi realizada a marcação com sonda para Ácido Hialurônico (AH), imunomarcação para o receptor de ácido hialurônico (CD44) e Proteoglicano de Condroitim sulfato (PGCS), que foram revelados com peroxidase/DAB. A seguir, as lâminas foram fotografadas em "scanner" de lâminas histológicas, sendo obtidas as imagens de todos os cortes presentes. Essas imagens foram submetidas a análises no software Image J, sendo que o gráfico acima representa a intensidade da marcação na área tumoral, tendo em vista que os tamanhos dos tumores são bem diferentes entre os dois grupos. FONTE: O Autor (2014).

5.6. O TRATAMENTO COM LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE PGHS

Tendo observado alteração em carboidratos totais, glicosaminoglicanos ácido hialurônico e proteoglicano de condroitim sulfato, o próximo passo foi investigar o que ocorre em glicoconjugados, em especial com os Proteoglicanos de Heparan Sulfato, moléculas altamente alteradas no procesos tumoral (O' CONNELL, 2011).

Assim, foram investigados inicialmente os Sindecans, Proteoglicano transmembrânico, contendo cadeias de Heparan Sulfato. A avaliação de Sindecam 1 se fez necessária, por essa molécula ter um papel essencial na progressão tumoral e metástase e, ser co-distribuída com o receptor de crescimento vascular endotelial 2 (VEGFR2) (ORECCHIA et al., 2013). Utilizando imunomarcção, com revelação por peroxidase-DAB foi observada a redução da expressão de Sindecam-1 no grupo tratado com LMWH em relação ao controle (FIGURA 24).

FIGURA 24. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE SINDECAM-1

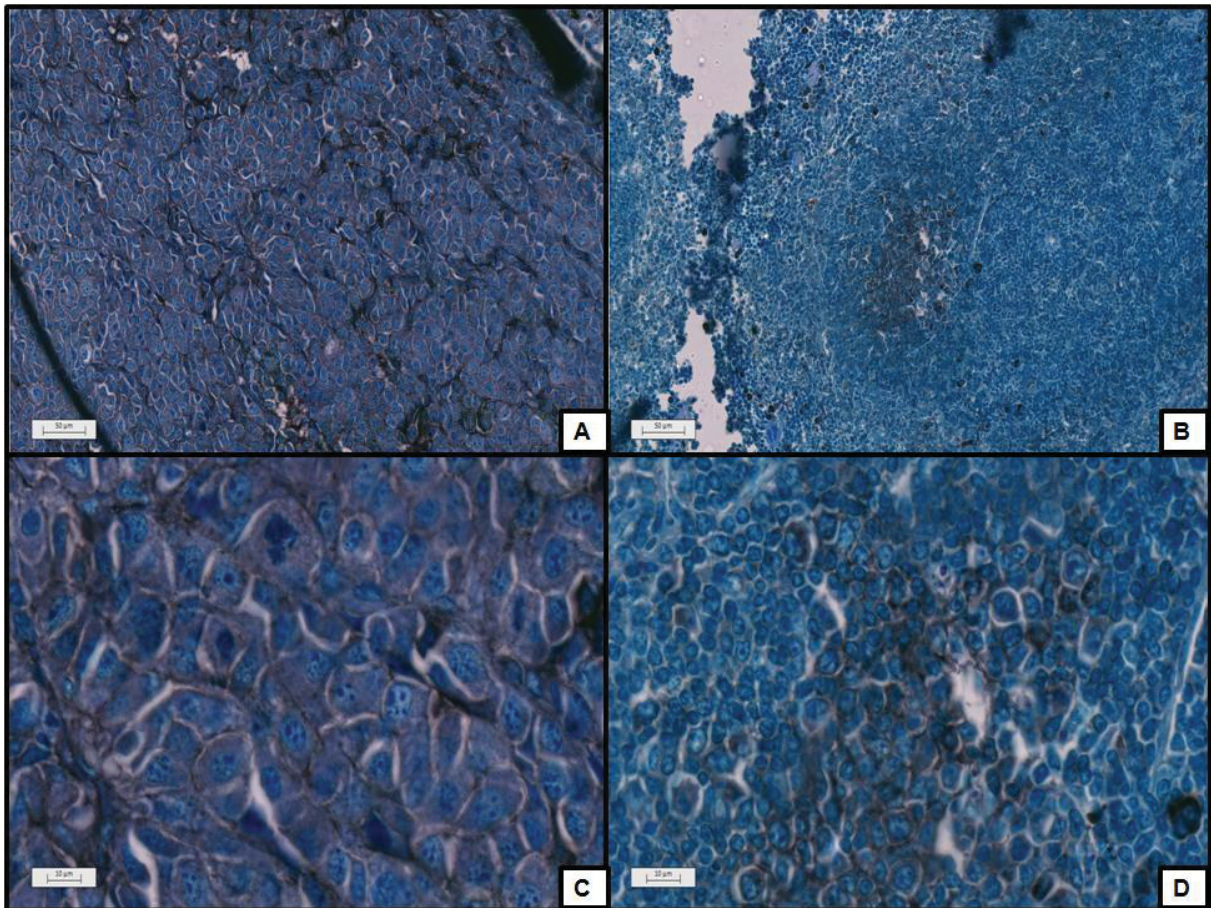


A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle A, C e com LMWH B, D) submetidos a imunohistoquímica para evidenciar

Sindecam-1, com posterior revelação com o complexo peroxidase-DAB, que marca em castanho/marrom. Observe que o tratamento com LMWH (B e D) revela uma menor quantidade desse proteoglicano, quando comparado com o grupo não tratado (A e C). O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 μm e inferior = 10 μm . FONTE: O Autor (2014).

O Sindecam 2 também é superexpresso no melanoma, níveis aumentados de Sindecam 2 conferem ao melanoma um fenótipo invasivo, pois este proteoglicano também parece regular a angiogênese (LEE et al, 2009). A detecção do Sindecam 2, foi realizada com a técnica de imunohistoquímica revelada por peroxidase-DAB, o tratamento por LMWH demonstrou reduzir a expressão desse proteoglicano em relação ao controle (FIGURA 25).

FIGURA 25. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE SINDECAM-2

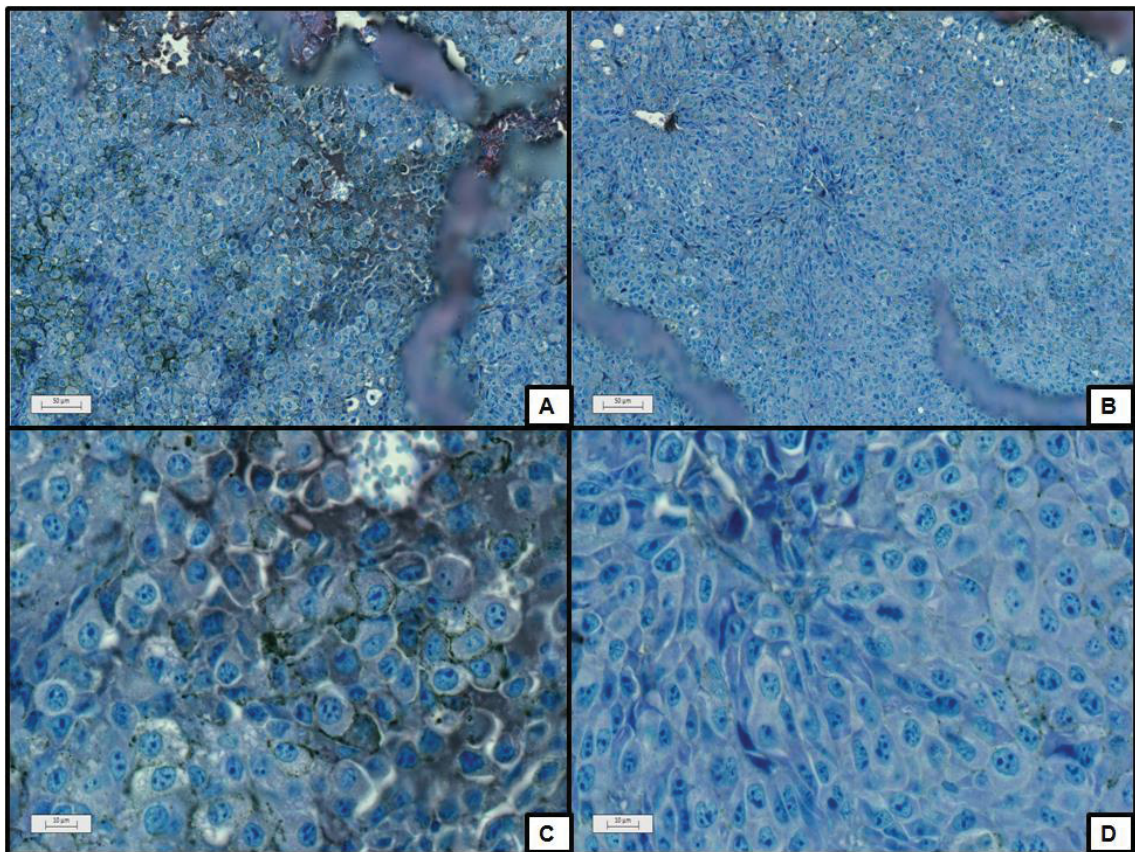


A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle A, C) com LMWH (B e D), submetidos imunomarcção para evidenciar Sindecam-2, com posterior revelação com o complexo peroxidase-DAB, que marca em castanho/marrom. Observe que o tratamento com LMWH (B e D) revela uma menor quantidade desse proteoglicano, quando comparado com o grupo não tratado (A e C). O painel inferior é uma ampliação

da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 μ m e inferior = 10 μ m. FONTE: O Autor (2014).

O Sindecam 4 é um proteoglicano de Heparan Sulfato que, como os Sindecans 1 e 2 regula a invasão celular (LABROPOULOU et al, 2013). Para realizar a detecção do Sindecam 4, foi utilizada imunomarcção evidenciada por peroxidase-DAB. Os resultados da imunohistoquímica por peroxidase mostraram redução nos níveis do proteoglicano (FIGURA 26).

FIGURA 26. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE SINDECAM-4

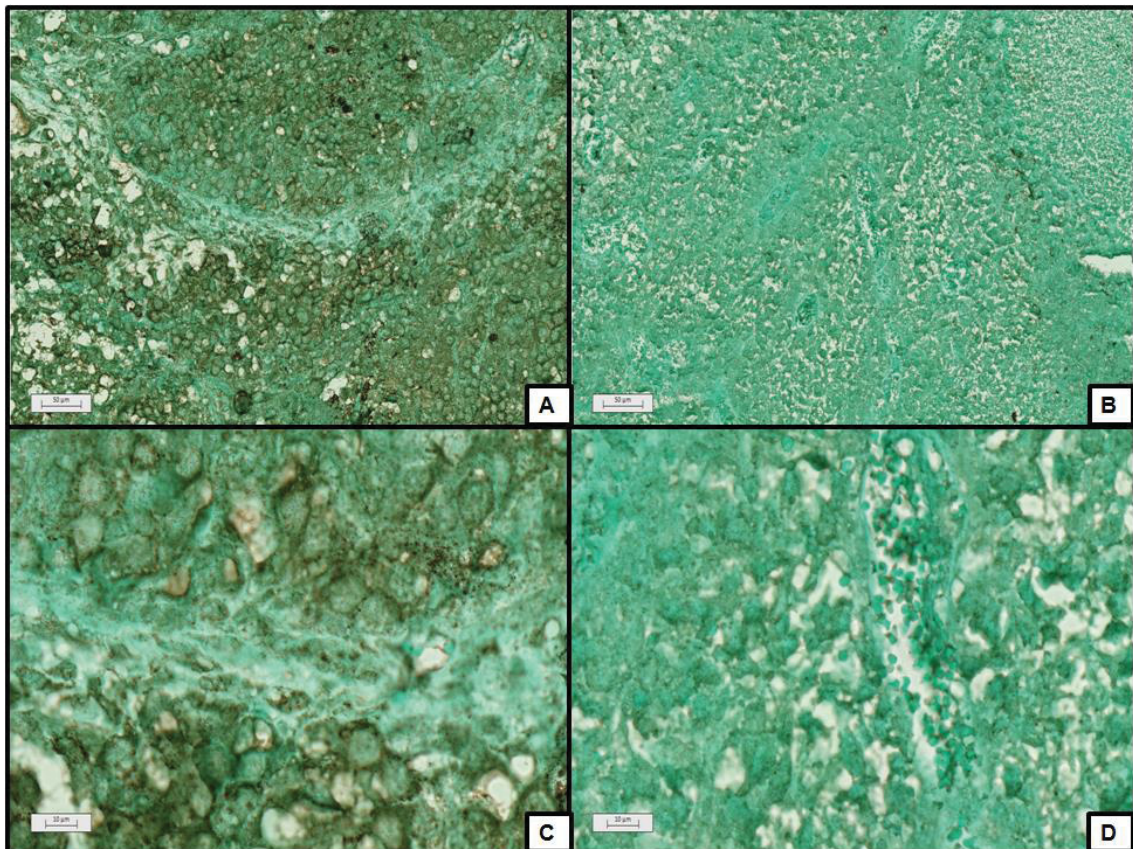


A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle – A e C) com LMWH (B e D), submetidos a imunomarcção para evidenciar Sindecam-4, com posterior revelação com o complexo peroxidase-DAB, que marca em castanho/marrom. Observe que o tratamento com LMWH (B e D) revela uma menor quantidade desse proteoglicano, quando comparado com o grupo não tratado (A e C). O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escâner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 μ m e inferior = 10 μ m. FONTE: O Autor (2014).

O passo seguinte foi avaliar outro proteoglicano de heparan sulfato, o glicam-1 (GPC1). Assim como os Sindecans participam na regulação das interações célula-

célula e é superexpresso no melanoma. Após a reação de imunomarcacão e revelacão com peroxidase-DAB, foi possível verificar que a quantidade de Glipicam-1 foi reduzida nos cortes histol3gicos dos animais tratados por LMWH em comparacão ao grupo controle (FIGURA 27).

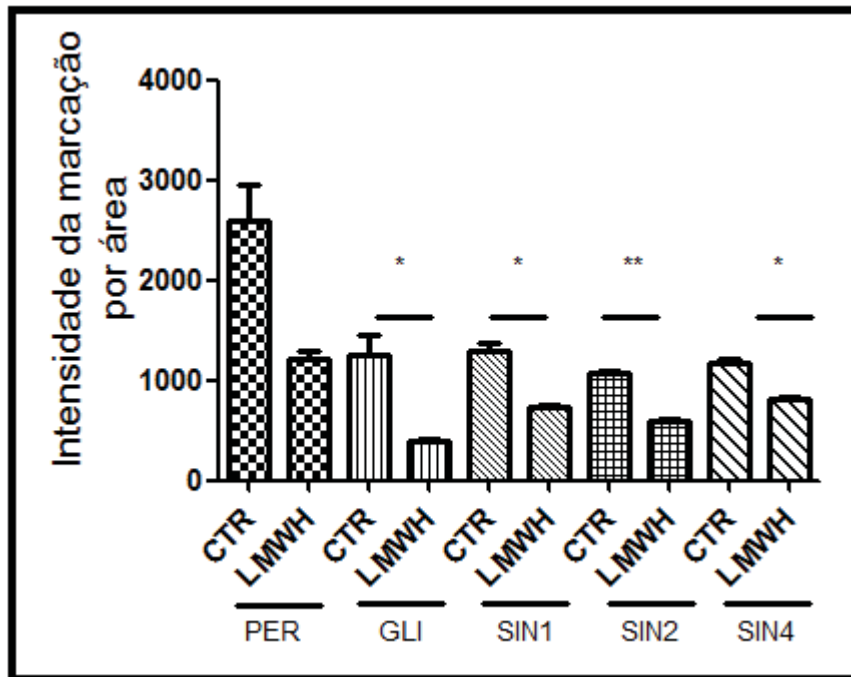
FIGURA 27. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE GLIPICAM-1 EM MELANOMA



A Figura acima mostra imagens de cortes histol3gicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou nã (controle - A e C) com LMWH (B e D), submetidos à imunomarcacão para detecção de Glipicam-1, com revelacão por peroxidase/DAB, que marca em castanho/marrom. Note que há muito mais marcacão no grupo controle (A e C) do que no grupo tratado com LMWH (B e D). FONTE: O Autor (2014).

A quantificacão das marcações revela que o tratamento com LMWH é efetivo na reduçã de todos os PGHS, com destaque para o Glipicam 1 que foi reduzido em Aproximadamente 69%, como mostra a FIGURA 28.

FIGURA 28. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE PGHS

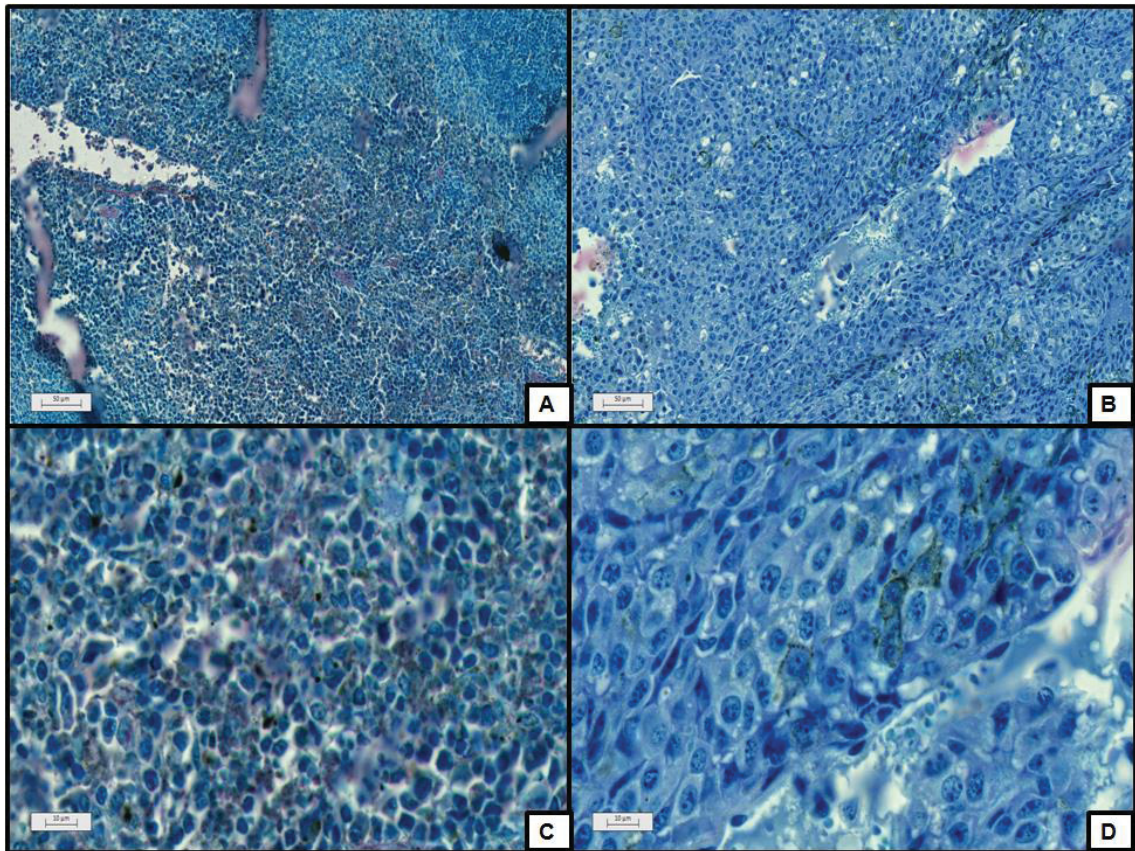


Lâminas contendo cortes histológicas de tumores sólidos, tanto de animais do grupo controle, quanto tratados, foram imunomarcados para detecção de Proteoglicanos de Heparan Sulfato (PGHS), utilizando anticorpos específicos para parte proteica de Sindecam 1 (SIND1), Sindecam 2 (SIND2), Sindecam 4 (SIND4), Glipicam 1 (GPC1) ou de Perlecan (PER), que foram revelados com peroxidase/DAB. A seguir, as lâminas foram fotografadas em “scanner” de lâminas histológicas, sendo obtidas as imagens de todos os cortes presentes. Essas imagens foram submetidas a análises no software Image J, sendo que o gráfico acima representa a intensidade da marcação na área tumoral, tendo em vista que os tamanhos dos tumores são bem diferentes entre os dois grupos. FONTE: O Autor (2014).

5.7. O TRATAMENTO COM LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE MMPS E AUMENTA A EXPRESSÃO DE RECK

O próximo passo foi avaliar metaloproteinases, que são enzimas que agem como sheddases, clivando os proteoglicanos. Através da reação de imunohistoquímica, com revelação por peroxidase/DAB observou-se que MMP2 está sensivelmente reduzida após o tratamento com LMWH em relação ao controle (FIGURA 29).

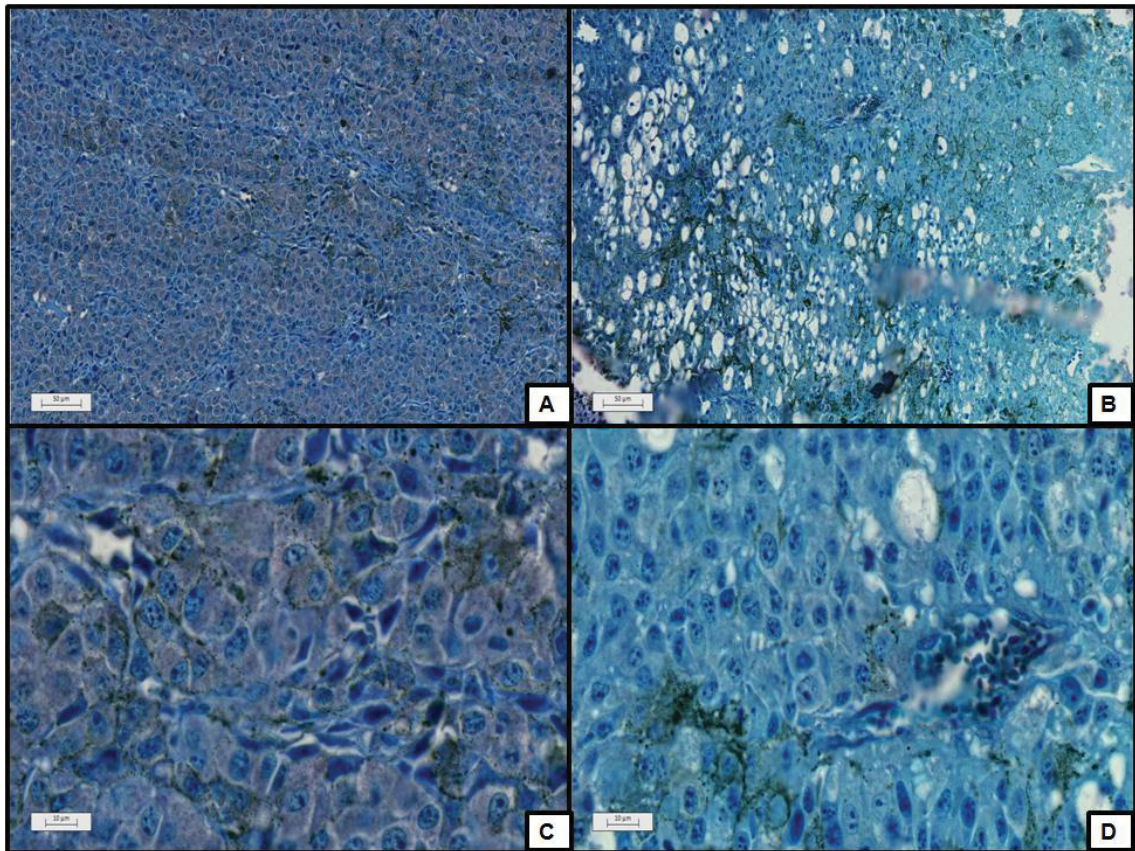
FIGURA 29. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE MMP2 EM MELANOMA MURINO



A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle – A e C) com LMWH (B e D), submetidos a imunomarcagem para evidenciar MMP-2, com posterior revelação com o complexo peroxidase-DAB, que marca em castanho/marrom. Observe que o tratamento com LMWH (B e D) revela uma menor quantidade dessa enzima, quando comparado com o grupo não tratado (A e C). Barras: Painel superior = 50 μm e inferior = 10 μm . FONTE: O Autor (2014).

Já a MMP9, que também é uma metaloproteinase do tipo gelatinase, mas liga-se a $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrina e regula a atividade da MMP2 (YANG et al, 2012), também atua como sheddase clivando os PGHS. A detecção de MMP9 foi realizada a técnica de imunomarcagem com revelação por peroxidase-DAB e mostrou redução na expressão por imunohistoquímica de MMP9, nos animais tratados com LMWH em relação ao controle (FIGURA 30).

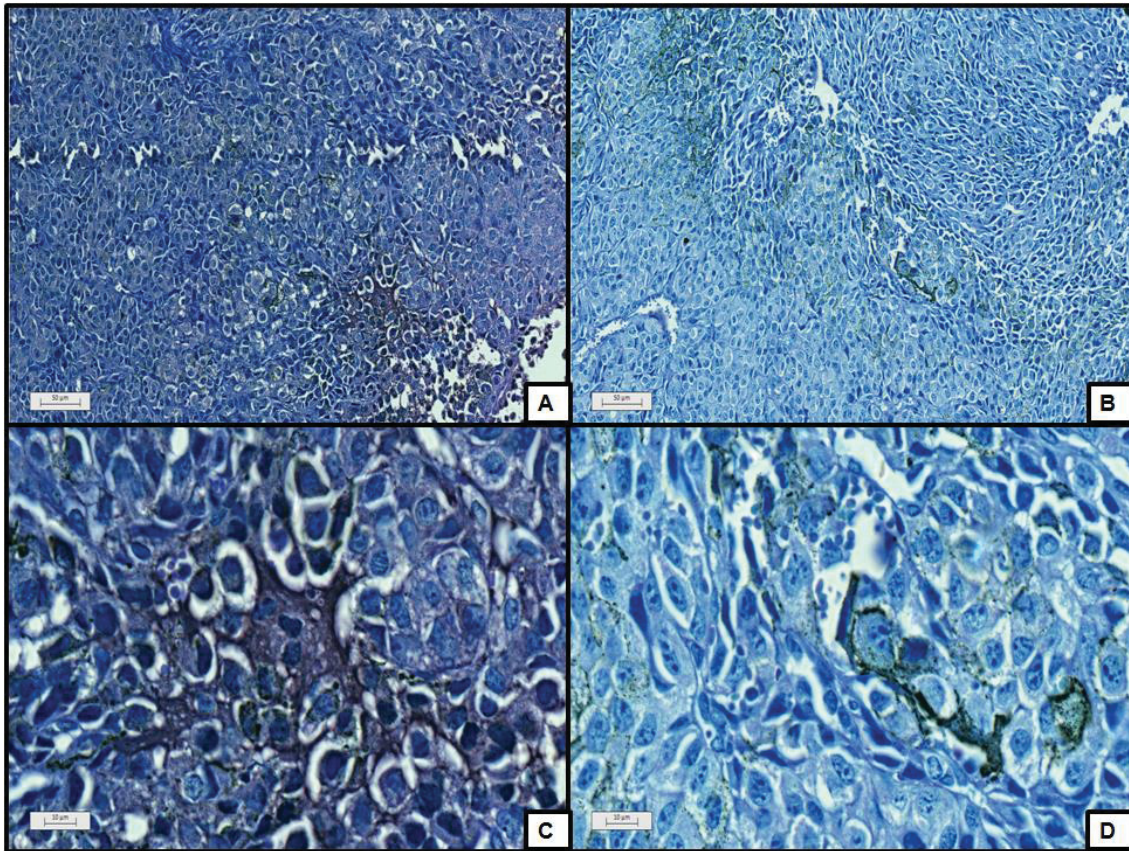
FIGURA 30. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE MMP9 EM MELANOMA



A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle A, C) com LMWH (B e D), submetidos imunomarcção para evidenciar MMP-9, com posterior revelação com o complexo peroxidase-DAB, que marca em castanho/marrom. Observe que o tratamento com LMWH (B e D) revela uma menor quantidade dessa enzima, quando comparado com o grupo não tratado (A e C). O painel inferior é uma ampliação da imagem superior, que foi obtida no Escãner de Lâminas Histológicas. Barras: Painel superior = 50 μm e inferior = 10 μm . FONTE: O Autor (2014).

Outra MMP que também é superexpressa em melanoma é a MT1-MMP, que é transmembrânica. Sua análise por imunomarcção e revelação por peroxidase/DAB está mostrada na FIGURA 31. Observa-se que houve uma nítida redução nos tumores de animais tratados com LMWH.

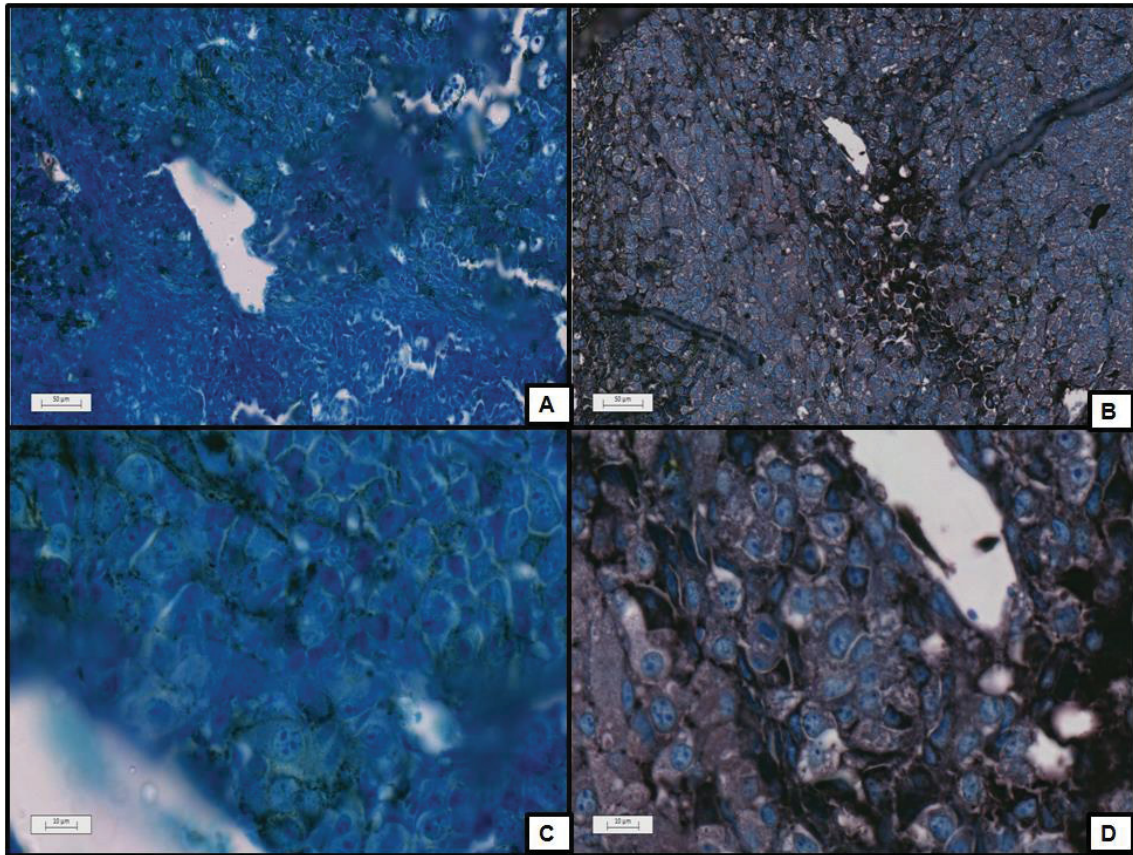
FIGURA 31. LMWH REDUZ EXPRESSÃO DE MT1-MMP EM MELANOMA



A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle – A e C) com LMWH (B e D), submetidos a imunomarcção para evidenciar MT1-MMP, com posterior revelação com o complexo peroxidase-DAB, que marca em castanho/marrom. Observe que o tratamento com LMWH (B e D) revela uma menor quantidade dessa enzima, quando comparado com o grupo não tratado (A e C). Barras: Painel superior = 50 µm e inferior = 10 µm. FONTE: O Autor (2014).

Por outro lado, a análise de um inibidor de metaloproteinasas foi realizada para confirmar os dados obtidos com a marcação das mesmas. Utilizando a imunomarcção com peroxidase/DAB foi realizada a evidenciação de RECK, um inibidor de MMP. O tratamento por LMWH levou a um grande aumento da expressão de RECK em relação ao controle (FIGURA 32).

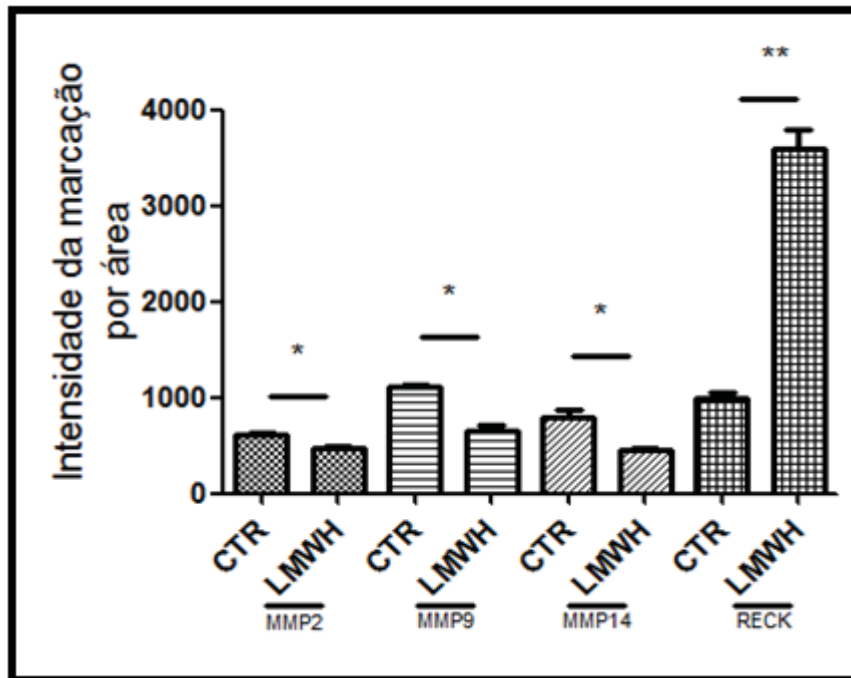
FIGURA 32. LMWH AUMENTA A EXPRESSÃO DE RECK EM MELANOMA MURINO



A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle - A e C) com LMWH (B e D), submetidos a imunomarcção para evidenciar RECK, com posterior revelação com o complexo peroxidase-DAB, que marca em castanho/marrom. Observe que o tratamento com LMWH (B e D) revela uma maior quantidade dessa proteína, quando comparado com o grupo não tratado (A e C). Barras: Painel superior = 50 μ m e inferior = 10 μ m. FONTE: O Autor (2014).

A quantificação das marcações de MMPs e do inibidor RECK confirma que a redução observada em MMPs foi significativa, sendo de 24% em MMP2, 41% em MMP9 e 43% em MT-MMP. Já para o seu receptor o aumento foi superior a 260%, como mostrado na FIGURA 33.

FIGURA 33. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES, E AUMENTA A EXPRESSÃO DE RECK

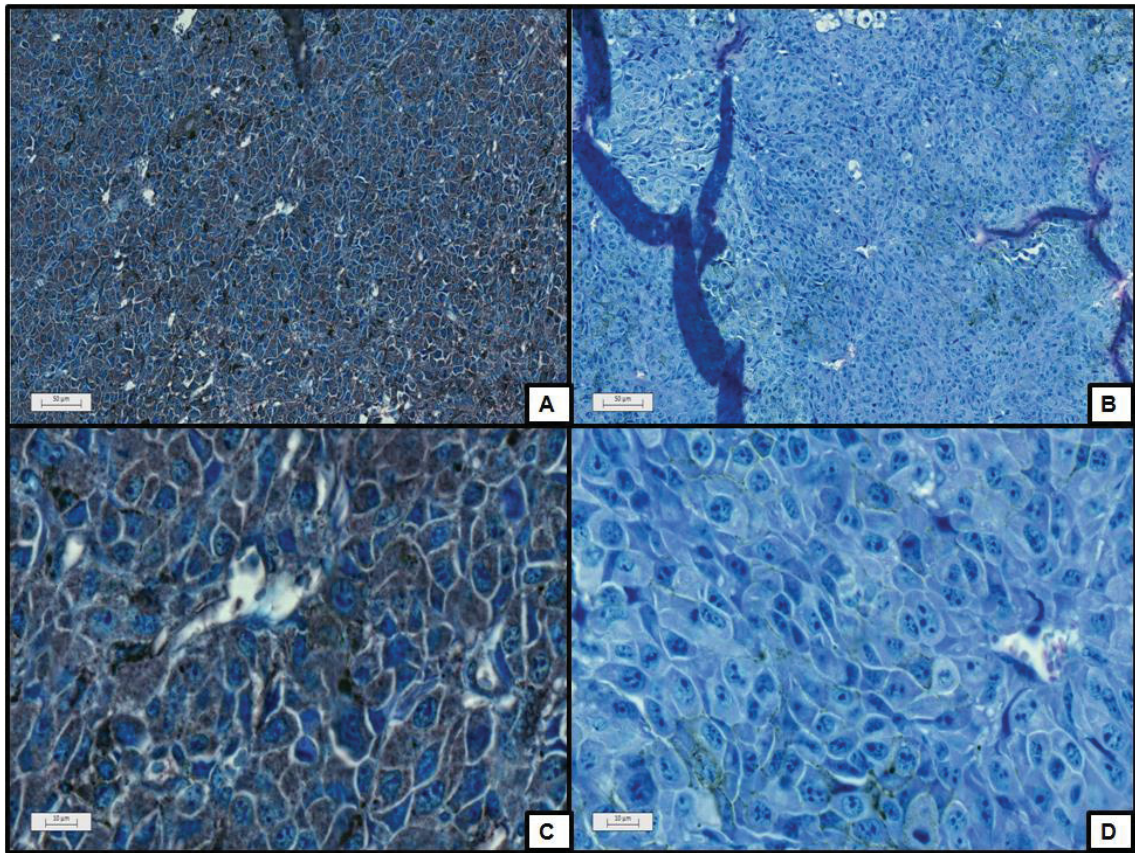


Lâminas contendo cortes histológicos de tumores sólidos, tanto de animais do grupo controle, quanto tratados, foram imunomarcados para detecção de MMPs (MMP2, MMP9 ou MMP14) ou para RECK e revelados com peroxidase/DAB. A seguir, as lâminas foram fotografadas em “scanner” de lâminas histológicas, sendo obtidas as imagens de todos os cortes presentes. Essas imagens foram submetidas a análises no software Image J, sendo que o gráfico acima representa a intensidade da marcação na área tumoral, tendo em vista que os tamanhos dos tumores são bem diferentes entre os dois grupos. FONTE: O Autor (2014).

5.8. O TRATAMENTO COM LMWH LEVA À REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE TCTP

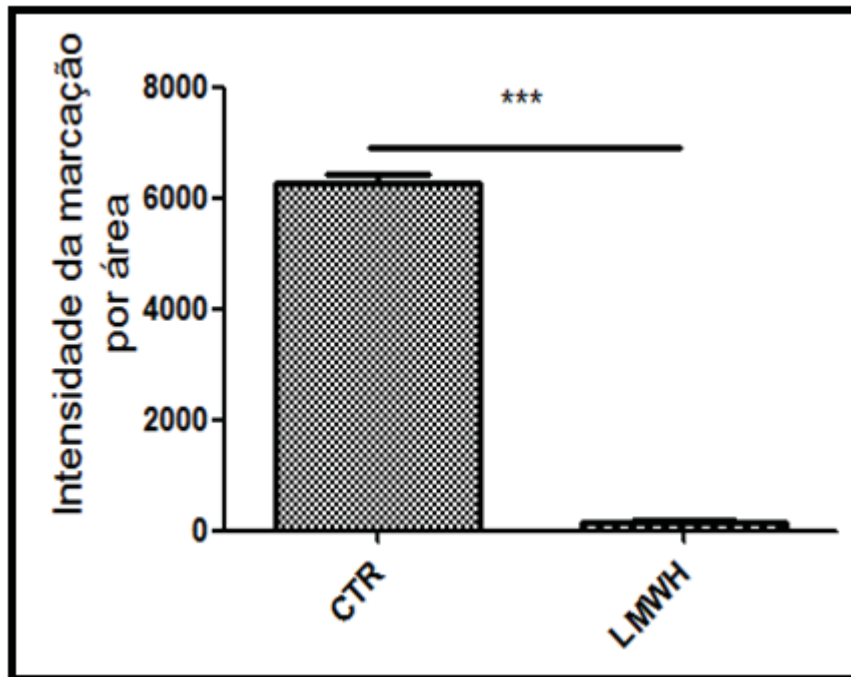
O presente estudo mostrou também a análise da expressão de um marcador de reversão tumoral o TCTP, a proteína TCTP é superexpressa em tumores malignos (AMSON et al, 2013). Com a técnica de imunohistoquímica com peroxidase foi realizada a marcação dessa molécula, onde o tratamento mostrou menor expressão deste marcador em relação ao controle (FIGURA 34). Quando quantificada a marcação observou-se, realmente, houve uma redução drástica de 97% (FIGURA 35).

FIGURA 34. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO DE TCTP EM MELANOMA



A Figura acima mostra imagens de cortes histológicos de tumores de melanoma murino de animais tratados ou não (controle A, C) com LMWH (B e D), submetidos imunomarcção para evidenciar TCTP, com posterior revelação com o complexo peroxidase-DAB, que marca em castanho/marrom. Observe que o tratamento com LMWH (B e D) revela uma maior quantidade dessa proteína, quando comparado com o grupo não tratado (A e C). Barras: Painel superior = 50 μm e inferior = 10 μm . FONTE: O Autor (2014).

FIGURA 35. LMWH REDUZ A EXPRESSÃO TCTP



Lâminas contendo cortes histológicos de tumores sólidos, tanto de animais do grupo controle, quanto tratados, foram imunomarcados para detecção de TCTP e revelados com peroxidase/DAB. A seguir, as lâminas foram fotografadas em "scanner" de lâminas histológicas, sendo obtidas as imagens de todos os cortes presentes. Essas imagens foram submetidas a análises no software Image J, sendo que o gráfico acima representa a intensidade da marcação na área tumoral, tendo em vista que os tamanhos dos tumores são bem diferentes entre os dois grupos. FONTE: O Autor (2014).

6. DISCUSSÃO

Uma das aplicações de terapia anticoagulante é o uso em pacientes com processos tumorais e que desenvolvem a Síndrome de Trousseau (descrita em 1865 por Armand Trousseau). Assim, em pacientes com câncer, diversas terapias anticoagulantes já foram descritas. O uso de heparina demonstrou ser mais eficiente no tratamento desta síndrome do que o wafarin (um anticoagulante oral, que age inibindo a regeneração da vitamina K) (BORSIG, 2004). Por outro lado, as observações de pacientes nessas condições que foram submetidos ao tratamento por heparina mostraram uma melhora na sobrevida, sugerindo uma atividade antitumoral para estes polissacarídeos (BORSIG, 2010).

Desde a década de 1960 muitos trabalhos foram realizados para avaliar o potencial antitumoral de heparina, e posteriormente de heparina de baixo peso molecular – LMWH (LECUMBERRI, PÁRAMO; ROCHA, 2005). Atualmente é conhecido o potencial desses compostos de diminuir a progressão do câncer metastático em carcinoma mamário, de cólon, pulmão, bem como em melanoma (para revisão, veja BORSIG, 2010). No entanto o mecanismo de ação destas moléculas permanece obscuro, o que motivou a realização o presente trabalho.

Vale salientar que, se por um lado já era conhecido que heparina e LMWH possuem ação antitumoral, tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”, os ensaios conduzidos em animais eram realizados utilizando a administração de heparina concomitante à inoculação das células tumorais ou, quando muito, iniciada no dia seguinte. Assim, de forma pioneira resolvemos iniciar o tratamento após a implantação do tumor (início do tratamento foi realizado no 5º dia, após a injeção das células B16-F10). O trabalho publicado que mais se aproxima dessa estratégia experimental foi realizado por Richie e Colaboradores (2011), mas utilizaram heparina quimicamente modificada (*N*-acetilada) e teve início no décimo dia após a inoculação das células tumorais. Além disso, para obter a resposta encontrada, utilizaram 60 mg/Kg e duração do tratamento também foi bem maior (seguiu por 28 dias). No entanto, nesse caso os autores utilizam mieloma como foco do estudo e não o melanoma, que é o que está em análise no presente trabalho.

Assim, inicialmente realizamos o tratamento com heparina não fracionada, iniciando a administração no 5º dia após a inoculação das células, e realizando um tratamento em dias intercalados, com intervalos de 3 dias, seguindo até o 17º dia (foram realizados injeção intraperitoneal de heparina com 5, 8, 11 e 14 dias após a inoculação das células). No entanto, a maioria dos animais desenvolveu hemorragia cutânea generalizada e, muitos, foram a óbito antes do término do período de tratamento (15 dias) (dados não mostrados).

A busca na literatura revelou que a LMWH é mais eficiente que a heparina não fracionada para a atividade antitumoral (BORSIG, 2010). Em adição, a grande vantagem da LMWH é desenvolver uma menor atividade hemorrágica, razão pelo qual testar em substituição e heparina não fracionada. O tratamento seguiu o mesmo que foi realizada para a heparina (não fracionada) (5mg/Kg, administradas nos dias 5, 8, 11 e 14 após a inoculação das células). No entanto, houve pouca redução da massa tumoral menor que 10%, de forma muito diferente ao que é relatado na literatura (para outras formas de administração) (dados não mostrados).

Por outro lado, permanecendo ainda refratários a realizar o tratamento convencional, que consiste no início da administração de heparina logo a seguir a injeção das células, pois isso não ocorre em pacientes (só inicia um tratamento após o diagnóstico de uma doença), resolveu-se fazer nova alteração do protocolo inicial, que consistiu em realizar a administração de LMWH diariamente e iniciando após o 6º dia de inoculação das células tumorais.

A favor desse ideia está o fato de que a, segundo Biwas (1998), as células de melanoma murino B16F10 (que foram também empregadas no presente estudo) são capazes de ligar heparina, o que poderia explicar, pelo menos em parte, o porque esse composto é capaz de reduzir a formação de tumor nesse tipo de tratamento, uma vez que ao ligar nas células de melanoma, pode impedir que essa faça o reconhecimento de moléculas chaves (PGHS, p.ex.), principalmente importantes para o seu mecanismo de migração e invasão tumoral.

Os resultados foram surpreendentes, pois houve uma redução de aproximadamente 70% do volume tumoral (FIGURAS 8 e 9). Assim, de forma pioneira este trabalho mostra que LMWH, quando administrada após o início do desenvolvimento do tumor (6ºdia) possui uma potente ação antitumoral.

O trabalho foi realizado utilizando duas doses de LMWH, sendo realizado três experimentos independentes com a dose de 1 mg/Kg e cinco experimentos com a dose de 5 mg/Kg. Os ensaios realizados com a utilização da dose menor do tratamento (1 mg/Kg), também mostraram redução tumoral, mas não foi tão proeminente quanto ao tratamento com 5 mg/Kg. Vale salientar que, de maneira geral, o tamanho dos tumores foi reduzido em ambas as doses de tratamento. No entanto, ao comparar os dois tratamentos nota-se que a dose de 5 mg/Kg foi mais efetiva (redução de aproximadamente 70% em comparação a 30% de 1 mg/Kg). Como os animais não apresentaram efeitos colaterais aparentes (como hemorragia) nos dois tratamentos, a dose de 5 mg/Kg foi escolhida como a efetiva. Assim, mais dois experimentos foram realizados com a dose de 5 mg/Kg, para obter amostras para extração de RNA e avaliação do crescimento tumoral, que ainda serão realizados na continuidade deste trabalho.

As análises histológicas, seguidas de quantificações das marcações obtidas, revelaram que enquanto a proliferação celular reduz aproximadamente 50%, por sua vez a morte celular pós apoptose aumenta em aproximadamente 100%, o que causa um impacto drástico no crescimento tumoral, o que poderia explicar tamanha diferença no volume tumoral, observa após o tratamento com LMWH.

Considerando o tamanho da alteração causada nestes dois parâmetros que afetam o crescimento tumoral, a avaliação da angiogênese se fez necessária e foi realizada com a utilização de um anticorpo contra VEGF, que é capaz de reconhecer as 4 variantes dessa molécula. Nessa análise foi observado que a redução na expressão de VEGF no grupo tratado foi aproximadamente de 50% em relação ao observado no controle. No entanto, essa marcação mostra um fator secretado, que estimula a produção de vasos como foi mostrado na Figura 15.

Além de VEGF outras moléculas importantes no desenvolvimento tumoral também foram avaliadas. Nesse sentido, destaca-se, a atividade de MMPs, pois degradam componentes da MEC, e têm um papel chave na modulação de fatores de crescimento, em especial aqueles que estavam aprisionados, por ligação a componentes da MEC, clivados pelas MMPs. O presente trabalho mostra redução nas MMPs 2, 9 e MT1-MMP, bem como aumento de um importante inibidor dessas MMPs, a RECK (CLARK et al., 2007). Assim, os dados desse trabalho mostram que há menor

quantidade de MMPs avaliadas, bem como aumento de seu inibidor. Esse conjunto poderia reduzir a degradação da MEC, por sua vez, levar a uma menor angiogênese mediada pela ação das MMPs e dos fatores de crescimento liberados. Heo e Cho (2014) corroboram com esta ideia, pois mostram que as metaloproteinases degradam a MEC, resultando na liberação de fatores de crescimento que estimulam a proliferação e migração de células endoteliais.

Outra abordagem envolve a análise dos glicoconjugados, que participam de processos de adesão e migração e podem também ser fatores angiogênicos, razões pelas quais muitos desses compostos estão superexpressos no melanoma, justificando a avaliação quantitativa da expressão dessas moléculas. Os resultados mostram que há uma redução importante em carboidratos totais (FIGURA 17). Com isso, foi realizada a quantificação de alguns glicoconjugados específicos que atuam na progressão tumoral.

O AH que é o um importante componente da MEC, é sintetizado por vários tipos celulares. Embora o melanoma produza pouco AH, é capaz de estimular fibroblastos a produzir. Ainda o melanoma produz e secreta hialuronidase, que cliva o AH em pequenos fragmentos, que são biologicamente ativos e atuam como moléculas angiogênicas, bem como levam ao aumento na expressão de MMP2 (WILLEMBERG et al, 2012). AH interage com seu receptor, CD44 e essa interação permite a regulação da proliferação e motilidade (KIM et al, 2008). Os resultados mostram que o tratamento com LMWH não provoca uma redução efetiva, tanto no AH como seu receptor CD44 (FIGURAS 18 e 19).

Quanto ao PGCS, também foi observado menor expressão deste PG em células tratadas com LMWH (FIGURA 20). Especificamente o PGCS4, que é o que foi avaliado, foi identificado na superfície de células de melanoma, e sua expressão está relacionada com a formação de tumores e com pobre prognóstico. Além disso, sua expressão está correlacionada com a resistência do melanoma a quimioterapia convencional (PRICE et al., 2012).

Quanto aos PGHS, quando se observa o melanoma, verifica-se que todos os PGHS que são produzidos por esse tumor estão superexpressos. Estudos sobre o síndecam-1 no melanoma como os realizados por O'Connell (2009) e Orecchia (2013) sugerem que, a expressão dessa molécula na superfície das células e sua

degradação da porção sacarídicas por heparanases são importantes determinantes no controle da invasão e metástase celular. Além disso, a expressão de sindecam-1 é correlacionada com aumento do potencial metastático em células de melanoma, o que foi confirmado em células de melanoma silenciadas (por knockdown) para esse proteoglicano, pois mostram redução da invasão (O'CONNELL et al., 2009).

Já o sindecam-2 é altamente expresso em células de melanoma, diferentemente de células de melanócitos normais. Da mesma forma que o sindecam-1, elevação da expressão do sindecam-2 aumenta a invasão e migração celular do melanoma. Em estudo realizado por Lee e colaboradores (2009), quando as células de melanoma foram tratadas com fator de crescimento de fibroblasto-2, conhecido por estimular a migração de células de melanoma, a expressão de sindecam-2 aumentou. Outro PGHS de superfície celular, também é importante no melanoma, é o Glipicam, sendo superexpresso. Novamente, nossos dados mostram que esses PGHSs também foram reduzidos após o tratamento com LMWH.

Por outro lado, o perlecam é um PGHS da MEC, sendo que em condição tumoral ocorre seu acúmulo, que propicia um microambiente favorável a angiogênese, crescimento e invasão celular (FJELDSTAD; KOLSET, 2005). Esse proteoglicano também mostrou estar reduzido após o tratamento realizado.

Em suma, todos os compostos que são superexpressos no melanoma, que foram avaliados, estão reduzidos após o tratamento. Muitas dessas moléculas estão envolvidas na ligação e “sequestro” de fatores de crescimento, que são angiogênicos, o que poderia explicar, pelo menos em parte, o porquê ocorre uma redução expressiva da quantidade de vasos sanguíneos, que por sua vez, levaria ao aumento da taxa de células em apoptose e diminuição da proliferação celular. Esse conjunto resulta no menor desenvolvimento do tumor ocasionado pelo tratamento com LMWH.

O trabalho deve continuar avaliando outros parâmetros, por exemplo, foi observado uma drástica redução da quantidade de melanina e há estudos que correlacionam a redução da melanogênese com diminuição do mecanismo de resistência a drogas (ZBYTEK et al., 2009). Assim, avaliação de moléculas envolvidas na melanogênese e de receptores que contribuem no transporte de drogas serão avaliados. Por outro lado, Peng e colaboradores (2014) sugerem que a regulação de melanogênese altera a ativação das vias que induzem a proliferação, onde os

receptores de melanocortina, quando ativados por α -MSH, aumentam os níveis intracelulares de cAMP, que por sua vez a ativam ERK e MAPK que levam a proliferação. Vale ressaltar que o presente trabalho mostrou uma grande redução da proliferação celular (FIGURA 13), o que reforça a necessidade de estudar esse parâmetro. Por outro lado, vale salientar que o tratamento com LMWH levou a uma grande redução do tamanho final do tumor (70%), mas também o dado que mostra o volume do tumoral ao longo do tratamento. Estes dados sugerem estadiamento tumoral, o que poderia estar relacionado com a regressão tumoral. Em favor dessa hipótese está na imensa redução da quantidade de TCTP (FIGURAS 32 e 33), que é conhecido como um marcador de reversão tumoral (LIU et al, 2014).

Novos ensaios devem ser conduzidos para confirmar essa hipótese, principalmente aqueles envolvendo o estudo da sobrevida, que podem ser realizados com a análise em sistema de imagem "*in vivo*", após a injeção de células fluorescentes ou que expressam luciferase, permitindo um acompanhamento diário até o óbito.

Ainda, vale destacar que o presente estudo focou sobre o tumor sólido, mas o melanoma tem caráter metastático e, portanto, é importante o estudo em modelo de metástase, como o pulmonar. Assim, nossos estudos serão conduzidos avaliando esse modelo para confirmar se nessa condição o tratamento com LMWH também poderá ser efetivo, bem como se é em decorrência da redução dos parâmetros malignos que mostram estar reduzidos nesse trabalho.

7. CONCLUSÃO

1. Heparina não fracionada leva ao sangramento do animal, mostrando-se não ser um tratamento adequado;
2. O melhor composto entre os testados foi LMWH, sendo o tratamento diário, iniciado no 6º dia após a injeção das células tumorais, até um dia antes (o 14º dia) do sacrifício.
3. A melhor dose de LMWH foi de 5 mg/Kg, nas condições experimentais testadas.
4. O tratamento com LMWH leva a um menor desenvolvimento do tumor, que mostra estar relacionado à uma menor angiogênese, seguida de aumento da morte celular (por apoptose) e menor proliferação tumoral.
5. O tratamento leva a redução de moléculas chaves no desenvolvimento de metástase, como AH, PGHS e PGCS, bem como de MMPs.
6. O tratamento com LMWH sugere regressão tumoral, por conta da expressão de TCTP.

REFERÊNCIAS

- AFRATIS, N.; GIALELI, C.; NIKITOVIC, D.; TSEGENIDIS, T.; KAROUSSOU, E.; THEOCHARIS, A. D.; PAVÃO, M. S.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. **FEBS J.**, v. 279, p. 1177-1197. 2012.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula 5ª edição*. **Artmed**, São Paulo, 2010.
- AMSON, R.; PECE, S.; DI FIORI, P. P.; TELERMAN, A. TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. **Trends Cell Biol.** v 23, n.1, p. 37-46, 2013.
- ATKINS, M. B.; LOTZE, M. T.; DUTCHER, J. P.; FISHER, R. I.; WEISS, G.; MARGOLIN, K.; ABRAMS, J.; SZNOL, M.; PARKINSON, D.; HAWKINS, M.; PARADISE, C.; KUNKEL, L.; ROSENBERG, S. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 2105–2116, 1999.
- BOON, T., PIERRE G. C.; EYNDE, B.J.V.D.; BRUGGEN, P.V.D. Human T Cell Responses Against Melanoma. **Annu. Rev. Immunol.** 24, 2006.
- BISWAS, C. (1988) Heparin and heparan sulfate binding sites on B-16 melanoma cells. **J. Cell. Physiol.** 136: 147-53.
- BORSIG, L. Selectins Facilitate Carcinoma Metastasis and Heparin Can Prevent Them. **News Physio Sci**, v.19, p.1621, 2004.
- BORSIG, L.: Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. **Experimental evidence.Thrombosis Research**, 125 Suppl., S66–S71, 2010.
- CATTARUZZA, S.; NICOLOSI, P. A.; BRAGHETTA, P.; PAZZAGLIA, L.; BENASSI, M. S.; PICCI, P.; LACRIMA, K.; ZANOCCO, D.; RIZZO, E.; STALLCUP, W. B.; COLOMBATTI, A.; PERRIS, R. NG2/CSPG4-collagen type VI interplays putatively involved in the microenvironmental control of tumour engraftment and local expansion. **J Mol Cell Biol.**, v.5(3), p.176-193, 2013.
- CÉBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJÄLLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis: complex partnerships. **Cell.Mol. Life Sci.** 63, 2006.
- CHAO, S.; HUANG, S.; HU, D.; LIN, H. Subtoxic Levels of Apigenin Inhibit Expression of VEGF by Uveal Melanoma Cells via Supression of ERK1/2 and PI3K/AktPathways. **Evid Based Complement Alternative Med.** p1-9, 2013.

CHAPMAN, P.B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C.; HAANEN, J.B.; ASCIERTO, P.; LARKIN, J.; DUMMER, R.; GARBE, C.; TESTORI, A.; MAIO, M.; HOGG, D.; LORIGAN, P.; LEBBE, C.; JOUARY, T.; SCHADENDORF, D.; RIBAS, A.; O'DAY, S.J.; SOSMAN, J.A.; KIRKWOOD, J.M.; EGGERMONT, A.M.M.; DRENO, B.; NOLOP, K.; LI, J.; NELSON, B.; HOU, J.; LEE, R.J.; FLAHERTY, K.T.; MCARTHUR, G.A. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **The New England Journal of Medicine**, 364;26, p2507-2516, 2011.

CHIARAVALLOTI, A. J; LADUCA, J. R. Melanoma Screening by Means of Complete Skin Exams for All Patients in a Dermatology Practice Reduces the Thickness of Primary Melanomas at Diagnosis. **J Clin Aesthet Dermatol**. 2014 Aug;7(8):18-22.

CLARK, W.H. JR; ELDER, D.E.; GUERRY, D; EPSTEIN, M.N.; GREENE, M.H.; VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum. Pathol.** 12, 1984.

CLARK, J. C. M.; THOMAS, D. M.; CHOONG, P. F. M.; DAS, C. R. RECK—a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. **Cancer Metastasis Rev** v. 26, p. 675–683, 2007.

COMODO, A. N; BACHI, A. L. L; SOARES, M. F; FRANCO, M; TEIXEIRA, V. P. C. Galectin-3 expression favors metastasis in murine melanoma. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, 2013, 4, 55-62.

CONEJO-GARCIA, J.R.; BENENCIA, F.; COURREGES, M.C.; KANG, E.; MOHAMED-HADLEY, A.; BUCKANOVICH, R.J.; HOLTZ, D.O.; JENKINS, A.; NA, H.; ZHANG, L.; WAGNER, D.S.; KATSAROS, D.; CAROLL, R.; COUKOS, G. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a β -defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. **Nature Medicine** 10, 2004.

CONESA, C.M.; SÁNCHEZ, N.A.; ORTEGA, V.V.; REVERTE, J.G.; CARPE, F.P.; ARANDA, M.C. In vitro and in vivo effect of IFN α on B16-F10 melanoma in two models: Subcutaneous (C57BL6J mice) and lung metastasis (Swiss mice). **Biomedicine & Pharmacotherapy** 63, 2009.

DESHAYES, F.; NAHMIAS, C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? **Trends in Endocrinology and Metabolism** 16, 2005.

DYE, E. D.; MEDIC, S.; ZIMAN, M.; COOMBE, D. R. Melanoma Biomolecules: Independently Identified but Functionally Intertwined. **Front Oncol**, 3-252, 2013.

EGAMI, K.; MUROHARA, T.; SHIMADA, T.; SASAKI, K.; SHINTANI, S.; SUGAYA, T.; ISHII, M.; AKAGI, T.; IKEDA, H.; MATSUIISHI, T.; IMAIZUMI, T. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. **The Journal of Clinical Investigation** 112, 2003.

ELKIN, M.; VLODAVSKY, I. Tail Vein Assay of Cancer Metastasis. **Current Protocols in Cell Biology** 12, 2001.

FIDLER, I.J. Selection of successive tumor lines for metastasis. **Nature New Biology** 242, 1973.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer** 3, 2002.

FINN, L.; MARKOVIC, S. N.; JOSEPH, R. W. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. **BMC Medicine**, v. 10, n. 1, p. 23-33, 2012.

FJELDSTAD, K.; KOLSET, S., O.; Decreasing the Metastatic Potential in Cancers – Targeting the Heparan Sulfate Proteoglycans. **Current Drug Targets**, v 6, p665-682, 2005.

FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for antiangiogenesis and normalization. **Microvasc Res.** 74, 2007.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chem. Biol. Drug Des.** 74: 455-482, 2008.

GARDLIK, R.; CELEC, P.; BERNADIC, M. Targeting Angiogenesis for Cancer (Gene) Therapy. **Bratisl Lek Listy** 112, 2011.

GARTEL, A.L. Is p21 an oncogene? **Mol. Cancer. Ther.** 5, 2006.

GIAVAZZI, R.; GAROFALO, A. Syngeneic Murine Metastasis Models. **Methods in Molecular Medicine** 58, 2001.

GARIBYAN, L.; FISHER, D. How sunlight causes melanoma. **Curr Oncol Rep**, 12:319-326, 2010.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–7, 2007.

GUIMARÃES, F.S.F.; ANDRADE, L.F.; MARTINS, S.T.; ABUD, A.P.; SENE, R.V.; WANDER, C.; TISCORNIA, I.; BOLLATI-FOGOLLIN, M.; BUCHI, D.F.; TRINDADE, E.S. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcareacarbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

GUPTA, G.P.; MASSAGUÉ, J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. **The Journal of Clinical Investigation** 114, 2004.

HEO, S.; CHO, J. *ELK3* Suppresses Angiogenesis by Inhibiting the Transcriptional Activity of ETS-1 on MT1-MMP. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 438-447, 2014.

- HIRATSUKA, S.; MARU, Y.; OKADA, A.; SEIKI, M.; NODA, T.; SHIBUYA, M. Involvement of Flt-1 Tyrosine Kinase (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1) in Pathological Angiogenesis. **Cancer Research** 61, 2001.
- HODI, F.; O'DAY, S.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W.; SOSMAN, J. A.; HAANEN, J. B.; GONZALEZ, R.; ROBERT, C.; SCHADENDORF, D.; HASSEL, J. C.; AKERLEY, W.; VAN DEN EERTWEGH, A. J. M.; LUTZKY, J.; LORIGAN, P.; VAUBEL, J. M.; LINETTE, G. P.; HOGG, D.; OTTENSMEIER, C. H.; LEBBÉ, C.; PESCHEL, C.; QUIRT, I.; CLARK, J. I.; WOLCHOK, J. D.; WEBER, J. S.; TIAN, J.; YELLIN, M. J.; NICHOL, G. M.; HOOS, A.; URBA, W. J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p.711-723, 2010.
- HOUGHTON, A.N.; POLSKY, D. Focus on melanoma. **Cancer Cell**. v. 2, p. 275-278, 2002.
- IBRAHIM, N.; HALUSKA, F. G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annual Review of Pathology*, v. 4, p. 551–579, 2009.
- IMAI, N.; HASHIMOTO, T.; KIHARA, M.; YOSHIDA, S.; KAWANA, I.; YAZAWA, T.; KITAMURA, H.; UMEMURA, S. Roles for host and tumor angiotensin II type 1 receptor in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. **Laboratory Investigation** 87, 2007.
- JUNG, J. Y.; KIM, H. S.; ROH, M. R.; ROH, H. J.; LEE, S. Y.; CHUNG, K. Y. The Effect of Imiquimod on Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Malignant Melanoma Cell Invasion. **Ann Dermatol**. Jun 2014; 26(3): 363–373.
- JOSEPH, E. W.; PRATILAS, C. A.; POULIKAKOS, P. I.; TADI, M.; WANG, W.; TAYLOR, B. S.; HALILOVIC, E.; PERSAUD, Y.; XING, F.; VIALE, A.; TSAI, J.; CHAPMAN, P. B.; BOLLAG, G.; SOLIT, D. B.; ROSEN, N. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14903–14908, 2010.
- KESSLER, J.H.; MULLAUER, F.B.; ROO, G.M. de; MEDEMA, J.P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulonic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. **Cancer Lett.**, p.1-14, 2006.
- KIM, Y.; LEE, Y.; CHOE, J.; LEE, H.; KIM, Y.; JEOUNG, D. CD44-Epidermal Growth Factor Receptor Interaction Mediates Hyaluronic Acid-promoted Cell Motility by Activating Protein Kinase C Signaling Involving Akt, Rac1, Phox, Reactive Oxygen Species, Focal Adhesion Kinase, and MMP-2*. **The Journal of Biological Chemistry** v. 283, n. 33, p. 22513–22528, 2008.
- KIM, H. C.; KIM, Y. S.; OH, H.; KIM, K.; OH, S.; KIM, J.; KIM, B. Y.; LEE, S.; CHOE, Y.; KIM, D. H.; KIM, S.; CHAE, S. W.; KIM, K. D.; LEE, H. G. Collagen Triple Helix

Repeat Containing 1 (CTHRC1) acts via ERK-dependent induction of MMP9 to promote invasion of colorectal cancer cells. **Oncotarget**, v. 5, n° 2, 2014.

KOCH, S.; TUGUES, S.; LI, X.; GUALANDI, L.; CLAESSION-WELSH, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Biochem. J.** 437, 2011.

KONDO, T. e HEARING, V.J. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. **Expert Ver Dermatol**, 6(1):97-108, 2011.

KAUFMAN, H. L.; KIRKWOOD, J. M.; HODI, F. S.; AGARWALA, S.; AMATRUDA, T.; BINES, S. D.; CLARK, J. I.; CURTI, B.; ERNSTOFF, M. S.; GAGEWSKI, T.; GONZALEZ, R.; HYDE, L. J.; LAWSON, D.; LOTZE, M.; MARGOLIN, K.; McDERMOTT, D. F.; MORTON, D.; PAVLICK, A.; RICHARDS, J. M.; SHARFMAN, W.; SONDAK, V. K.; SOSMAN, J.; STEEL, S.; TARHINI, A.; THOMPSON, J. A.; TITZE, J.; URBA, W.; WHITE, R.; ATKINS, M. B. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. **Nat. Rev. Clin. Oncol.** v10, p588–598, 2013.

LABROPOULOU, V. T.; SKANDALIS, S. S.; RAVAZOULA, P.; PERIMENIS, P.; KARAMANOS, N. K.; KALOFONOS, H. P. ; THEOCHARIS, A. D. Expression of Syndecan-4 and Correlation with Metastatic Potential in Testicular Germ Cell Tumours. **BioMed Research Intenational**, v. 2013, id 214864, 2013.

LAURENZANA, A; BIAGIONI, A; D'ALESSIO, S; BIANCHINI, F; CHILLÀ, A; MARGHERI, F; LUCIANI, C; MAZZANTI, B; PIMPINELLI, N; TORRE, E; DANESE, S; CALORINI, L; ROSSO, M. D; FIBBI, G. Melanoma cell therapy: Endothelial progenitor cells as shuttle of the MMP12 uPAR-degrading enzyme. **Oncotarget**. Jun 2014; 5(11): 3711–3727.

LEE, J. H.; PARK, H.; CHUNG, H.; CHOI, S.; KIM, Y.; HANN, H. J.; SEONG, I.; KIM, J.; KANG, K. G.; HAN, I. O.; OH, E. S. Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells. **J BiolChem**, v. 284, p. 27167-27175. 2009.

LEITER, U.; MEIER, F.; SCHITTEK, B.; CLAUS, GARBE, C. The Natural Course of Cutaneous Melanoma. **Journal of Surgical Oncology** 86, 2004.

LI, J.; CUI, Y.; WANG, Q.; GUO, D.; PAN, X.; WANG, X.; BI, H.; CHEN, W.; LIU, Z.; ZHAO, S. The proliferation of malignant melanoma cells could be inhibited by ranibizumab via antagonizing VEGF through VEGFR1 **Mol Vis**, 2014; 20: 649–660.

LIU, L. K; WU, H. F; GUO, Z. R; CHEN, X. J; YANG, D; SHU, Y. Q; ZHANG, J. N. Targeted Efficacy of Dihydroartemisinin for Translationally Controlled Protein Expression in a Lung Cancer Model. **Asian Pac J Cancer Prev**, 15 (6), 2511-2515, 2014.

LOOSE, D.; VAN DE WIELE, C. The Immune System and Cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceutical** 24, 2009.

MACHADO, C. M. L; ANDRADE, L. N. S; TEIXEIRA, V. R; COSTA, F. F; MELO, C. M; SANTOS, S. N; NONOGAKI, S; LIU, F; BERNARDES, E. S; CAMARGO, A. A; CHAMMAS, R. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGFb1-induced macrophages. **Cancer Medicine** 2014; 3(2): p 201–214.

MARNEROS, A.G. Tumor Angiogenesis in Melanoma. **Hematol Oncol Clin N Am** 23, 2009.

MATHEWS, M. B. Molecular biology, biochemistry and biophysics of connective tissue. Macromolar structure and evolution. In: Kleinzeller, A.; Springer, G. K. & Wittman, H. G. (Eds). **Springer-Verlag**, New York, vol. 19, p.99,104,135,175,213, 1975.

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nature Reviews Cancer** 6, 2006.

MENG, N.; LI, Y.; ZHANG, H.; SUN, X-F. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. **Histology and Histopathology**, v. 23, p. 1003-1010, 2008.

MUÑOZ, E. M.: LINHARDT, R. J. Heparin-Binding Domains in Vascular Biology, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. V.24, p.1549-1557, 2004.

NADER, H. B.; LOPES, C. C.; ROCHA, H. A. O.; SANTOS, E. A.; DIETRICH, C. P. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 1-15, 2004.

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences** 70, 2002.

NOZAWA, H.; CHIU, C.; HANAHAN, D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. **PNAS** 103, 2006.

O' CONNELL, M. P.; FIORI, J. L.; KERSHNER, E. K. FRANK, B. P.; INDIG, F.E.; TAUB, D.D.; HOEK, K. S.; WEERATANA, A. T. Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells. **J Biol Chem**, v. 284, p. 28704-28712. 2009.

O' CONNELL, M. P.; WEERARATNA, A. T. A spoonful of sugar makes the melanoma go: the role of heparan sulfate proteoglycans in melanoma metastasis. **Pigment Cell Melanoma Res**. 24; 1133–1147, 2011.

OBA-SHINJO, S.M.; CORREAY, M.; RICCAY, T.I.; MOLOGNONIY, F.; PINHAL, M.A.; NEVES, I.A.; MARIE, S.K.; SAMPAIOZ, L.O.; NADER, H.B.; CHAMMAS, R.; JASIULIONIS, M.G. Melanocyte Transformation Associated with Substrate Adhesion Impediment. **Neoplasia** 8, 2006.

ORECCHIA, P.; CONTE, R.; BALZA, E.; PETRETTO, P.; MAURI, P. L.; MINGARI, M. C.; CARNEMOLLA, B. A novel human anti-syndecan-1 antibody inhibits vascular maturation and tumor growth in melanoma. **European Journal of Cancer** v 49, p 2022– 2033, 2013.

OTAKE, A.H.; MATTAR, A.L.; FREITAS, H.C.; MACHADO, C.M.L.; NONOGAKI, S.; FUJIHARA, C.K.; ROBERTO ZATZ, R.; CHAMMAS, R. Inhibition Of Angiotensin II Receptor 1 Limits Tumor-Associated Angiogenesis And Attenuates Growth Of Murine Melanoma. **Cancer Chemotherapy Pharmacol**, 2009.

PAHWA, S.; STAWIKOWSKI, M. J.; FIELDS, G. B.; Monitoring and Inhibiting MT1-MMP during Cancer Initiation and Progression. **Cancers**, v. 6, p.416-435, 2014.

PAWELETZ, C.P.; CHARBONEAU, L.; LIOTTA, L.A. Overview of Metastasis Assays. **Current Protocols in Cell Biology** 12, 2001.

PENG, H.Y; LIN, C.C; WANG, H.Y; SHIH, Y; CHOU, S. T. The Melanogenesis Alteration Effects of *Achillea millefolium* L. Essential Oil and Linalyl Acetate: Involvement of Oxidative Stress and the JNK and ERK Signaling Pathways in Melanoma Cells. **PLoS ONE** 9(4): e95186. doi: 10.1371/journal.pone.0095186, 2014.

PEPPICELLI, S; BIANCHINI, F; CALORINI, L. Inflammatory cytokines induce vascular endothelial growth factor-C expression in melanoma-associated macrophages and stimulate melanoma lymph node metastasis. **Oncol Lett.**, Sep 2014; 8(3): 1133–1138.

POLSKY, D.; BASTIAN, B.C.; HAZAN, C.; MELZER, K.; PACK, J.; HOUGHTON, A.; BUSAM, K.; CORDON-CARDO, C.; OSMAN, I. HDM2 Protein Overexpression, but not Gene Amplification, is Related to Tumorigenesis of Cutaneous Melanoma. **Cancer Research** 61, 2001.

PORTICH, F. B. **Complexos naturais altamente diluídos reduzem fenótipo metastático de células de melanoma murino (B16F10)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2014.

PRICE, M. A.; WANSHURA, L.E.C.; YANG, J.; CARLSON, J.; XIANG, B.; LI, G.; FERRONE, S.; DUDEK, A.Z.; TURLEY, E. A.; McCARTHY, J. B. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, 24(6): 1148–1157, 2011.

RAK, J.; MILSON, C.; MAY, L.; KLEMENT, P.; YU, J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. **Semin Thromb Hemost.**, v.32, p. 54-70, 2006.

RANJAN, A; KALRAIYA, R. D. Invasive Potential of Melanoma Cells Correlates with the Expression of MT1-MMP and Regulated by Modulating Its Association with

Motility Receptors via N-Glycosylation on the Receptors. **Biomed Res Int.** 2014; 2014: 804680.

RASO-BARNETT, L.; BANKY, B.; BARBAI, T.; BECSAGH, P.; TIMAR, J.; RASO, E. Demonstration of a melanoma-specific CD44 alternative splicing pattern that remains qualitatively stable, but shows quantitative changes during tumour progression. **Plos One**, v. 8, p. 1-11, 2013.

REICHRATH, J.; RASS, K.; Ultra Violet Damage, DNA Repair and Vitamin D in Nonmelanoma Skin Cancer and in Malignant Melanoma. **Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer**, 2^o ed, p 208-233, 2014.

REILAND, J.; SANDERSON, R. D.; WAGUESPACK, M.; BARKER, S. A.; LONG, R.; CARSON, D. D.; MARCHETTI, D. Heparanase Degrades Syndecan-1 and Perlecan/Heparan Sulfate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n^o.9, 2004.

REMACLE, A. G.; SHIRYAEV, S.A; GOLUBKOV, V. S; FRESKOS, J. N; BROWN, M. A; KARWA, A. S; NAIK, A. D; HOWARD, C. P; SYMPSON, C. J; STRONGIN, A. Y. Non-destructive and Selective Imaging of the Functionally Active, Pro-invasive Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) Enzyme in Cancer Cells. **J. Biol. Chem.** 2013, 288:20568-20580.

RIDGWAY, L. D.; WETZEL, M. D.; MARCHETTI, D. Modulation of GEF-H1 Induced Signaling by Heparanase in Brain Metastatic Melanoma Cells. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 111, p. 1299-1309, 2010.

RITCHIE, J. P.; RAMANI, V. C.; REN, Y.; NAGGI, A.; TORRI, G.; CASU, B.; PENCO, S; PISANO, C.; CARMINATI, P.; TORTORETO, M.; ZUNINO, F.; VLODAVSKY, I.; SANDERSON, R. D.; YANG, Y. SST0001, Chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis. **Clin Cancer Res.** 17(6): 1382–1393, 2011.

SAMPAIO, L.O. et al. Heparins and heparan sulfates. Structure, distribution and protein interactions. In: VERLI, H. Insights into carbohydrate structure and biological function. **Kerala: Transworld research network**, p. 1-19, 2006.

SHEN, F.; KIRMANI, K.Z.; XIAO, Z.; THIRLBY B.H.; HICKEY, R.J.; MALKAS, L.H. Nuclear Protein Isoforms: Implications for Cancer Diagnosis and Therapy. **Journal of Cellular Biochemistry** 112, 2011.

SIENNA, C. **Efeitos do extrato das cascas de Rauwolfiasellowii Müll. Arg. e suas frações sobre a viabilidade e a melanogênese em células de melanoma murino B16-F10.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SIISKONEN, H.; RILLA, K.; KÄRNÄ, R.; BART, G.; JING, W; HALLER, M. F.; DEANGELIS, P. L.; TAMMI, R. H.; TAMMI, M. Hyaluronan in cytosol—Microinjection-

based probing of its existence and suggested functions. **GLYCOBIOLOGY**, v. 23, p. 222-231, 2012.

SIRONEN, R.K.; TAMMIB, M.; TAMMIB, R.; AUVINENC, P.K.; ANTTILA, M.; KOSMA, V.M. Hyaluronan in human malignancies. **Experimental Cell Research** 317, 2011.

SOENGAS, M.S.; CAPODIECI, P.; POLSKY, D.; MORA, J.; ESTELLER, M.; OPITZ-ARAYA, X.; MCCOMBIE, R.; HERMAN, J.G.; GERALD, W.L.; LAZEBNIK, Y.A.; CORDÓN-CARDÓ, C.; LOWE, S.W. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature** 409, 2001.

SMORENBURG, S. M; NOORDEN, C. J. F. V. The Complex Effects of Heparins on Cancer Progression and Metastasis in Experimental Studies. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic Pharmacol Rev** 53:93–105, 2001.

STAMENKOVIC, I.; YU, Q.; Shedding Light on Proteolytic Cleavage of CD44: The Responsible Sheddase and Funcional Significance of Shedding. **J Invest Dermatol.** v129(6), p1321–1324, 2009.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Cytotoxic molecules from natural sources: tapping the brazilian biodiversity. **Anticanc Ag Med Chem.** v. 6, p. 367-375, 2006.

SUN, J. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Are Essential for the Inflammatory Response in Cancer Cells. **Journal of Signal Transduction**, Volume 2010, Article ID 985132, 7 pages.

TARHINI, A.A; LIN, Y; YEKU, O; LAFRAMBOISE, W.A; ASHRAF, M; SANDER, C; LEE, S; KIRKWOOD, J. M. A four-marker signature of TNF-RII, TGF- α , TIMP-1 and CRP is prognostic of worse survival in high-risk surgically resected melanoma. **Journal of Translational Medicine** 2014, 12-19.

TELERMAN, A.; AMSON, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nature Reviews Cancer* v. 9, p. 206-216, 2009.

THOMPSON, K.H.; ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. **Dalton Trans.** v. 14, p. 761-4, 2006.

TOOLE, B. P. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. **Glycobiology**, v. 12, p. 37-42, 2002.

VARKI, A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. **Blood**, v.110, p.1723-1729, 2007.

VULTUR, A.; HERLYN, M. SnapShot: Melanoma. **CancerCell**. v.23, 5^a Ed., p.706–706., 2013.

WARDROP, D.; KEELING, D. The story of the Discovery of heparin and warfarin. **British Journal of Haematology**, v. 141, p. 757-763, 2008.

WEINBERG, R. A. The Biology of Cancer second edition. **Garland Science**, New York, 2014.

WELCH, D.T. Technical considerations for studying cancer metastasis *in vivo*. **Clin. Exp. Metastasis** 15, 1997.

WILLENBERG, A.; SAALBACH, A.; SIMON, J. C.; ANDEREGG, U. Melanoma Cells Control HA Synthesis in Peritumoral Fibroblasts via PDGF-AA and PDGF-CC: Impact on Melanoma Cell Proliferation. **Journal of Investigative Dermatology**, v 132, p.385-393, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> (Acesso em 03 de novembro de 2011).

YANG, J.; XUE, F.; YINPENG, Z.; RUIFEI, W.; SHENG, Z.; WENGUANG, L.; XIANLU, Z. Matrix metalloproteinase-2 Promotes $\alpha\beta 3$ Integrin-Mediated Adhesion and Migration of Human Melanoma Cells by Cleaving Fibronectin. **Plos One**, v.7, ed.7^a, 2012.

YOSHIURA, K.; NISHISHITA, T.; NAKAOKA, T.; YAMASHITA, N.; YAMASHITA, N. Inhibition of B16 melanoma growth and metastasis in C57BL mice by vaccination with a syngeneic endothelial cell line. **BMC Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** 28, 2009.

YAU, J. W.; STAFFORD, A. R.; LIAO, P.; FREDENBURGH, J. C.; ROBERTS, R.; WEITZ, J. I. Mechanism of catheter thrombosis: comparison of the antithrombotic activities of fondaparinux, enoxaparin, and heparin in vitro and in vivo. **Blood** 2011, 118:6667-6674.

YU, L.; GARG, H., G.; LI, B.; LINHARDT, R., J.; HALES, C. A.; Antitumor Effect of Butanoylated Heparin with Low Anticoagulant Activity on Lung Cancer Growth in Mice and Rats. **Current Cancer Drug Targets**, v. 10, p 229-241, 2010.

ZBYTEK, B., CARLSON, J.A.; GRANESE, J.; ROSS, J.; MIHIM, M.C.; SLOMINSKI, A. Currents concepts of metastasis in melanoma. **Expert Review of Dermatology**, v. 3, n. 5, p. 569–585, 2009.