

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Rafael José Munhoz de Oliveira

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE CÂNCER E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS GÊNEROS *PLEUROTUS*,
LENTINUS E *AGARICUS*. ESTUDO *IN VITRO* UTILIZANDO-SE
A LINHAGEM B16F10 (MELANOMA MURINO).

CURITIBA

2011

Rafael José Munhoz de Oliveira

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE CÂNCER E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS GÊNEROS *PLEUROTUS*,
LENTINUS E *AGARICUS*. ESTUDO *IN VITRO* UTILIZANDO-SE
A LINHAGEM B16F10 (MELANOMA MURINO).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Paraná para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Regina Cavichiolo
Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva
Trindade

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho Nele e por todas as graças recebidas ao longo desta caminhada.

A minha família, a qual eu amo muito, pela unidade familiar, diálogo, compreensão e incentivo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Célia Regina, a qual considero minha “Mãezona Científica”, pela paciência, apoio, dedicação e sobretudo para que a cada dia eu evoluísse como pessoa e como profissional.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Edvaldo, pelas muitas conversas e conselhos, os quais muito me ajudaram e que sempre levarei comigo na vida pessoal e profissional.

Aos professores, doutorandos, mestrandos, alunos de Iniciação Científica, estagiários, enfim, todos os integrantes do nosso grupo de pesquisa que de alguma forma contribuíram para a realização desta monografia.

A Profa. Dra. Elaine R. Carbonero (Departamento de Química - *Campus* Catalão, da Universidade Federal de Goiás) e ao Prof. Dr. Marcello Iacomini (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná) por toda ajuda, colaboração e parceria com este projeto.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, e seus técnicos e funcionários, pela ajuda e atenção recebida.

Ao CNPq, CAPES, e Fundação Araucária pelo incentivo financeiro e pela oportunidade da realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas, por estarem presentes nos momentos alegres e difíceis de nossa convivência.

Em especial, a Francine, que por um período Deus colocou ao meu lado, a qual muito me ensinou e ajudou, e por esse motivo serei sempre grato.

RESUMO

Estatísticas afirmam que a segunda maior causa de morte no Brasil desde 2003 ocorre por câncer, em um panorama geral, isso equivale a 17% dos óbitos. Esta doença é caracterizada pela proliferação desordenada de células, incapacidade de diferenciação celular e capacidade de invasão tecidual (metástases). O melanoma é um tipo de câncer muito agressivo, com uma alta taxa de mortalidade, que possui origem em melanócitos que sofreram alterações genóticas e/ou fenotípicas, pelo seu alto potencial metastático é considerado muito grave. Por ser tratar de um câncer muito agressivo, as terapias existentes não têm grande eficácia nos tratamentos convencionais, além de apresentarem muitos efeitos colaterais, os quais são, na maioria das vezes, incuráveis. Embora haja uma busca incansável pelos melhores tratamentos, observamos uma limitação nas drogas antitumorais, pelos seus efeitos colaterais e toxicidade das quimioterapias usuais. Existem relatos na literatura de que fungos são fonte de várias substâncias bioativas, entre elas podemos citar: terpenóides, esteróides, proteínas, lectinas, proteoglicanos e especialmente os polissacarídeos, com capacidade de modulação do sistema imunológico, bem como ação antitumoral, dentre outras atuações. São exemplos de polissacarídeos: as manogalactanas, fucomanogalactanas e fucoglucogalactanas. Com o objetivo de minimizar os efeitos colaterais das terapias padrões, propomos neste projeto investigar o possível potencial antitumoral de 6 diferentes polissacarídeos, extraídos e isolados de fungos dos gêneros: *Pleurotus*, *Agaricus* e *Lentinus*. Foram realizadas análises *in vitro* com a linhagem tumorigênica B16F10 (melanoma murino). Essa linhagem foi exposta aos diferentes polissacarídeos na concentração de 500µg/mL em curva de tempo, e posterior avaliação de específicas dinâmicas e eventos celulares, foram desenvolvidos dentro deste trabalho os seguintes ensaios: viabilidade celular, citotoxicidade celular e avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas pela ação destes diferentes polissacarídeos. Os resultados obtidos nos mostram que os polissacarídeos P1, P2, P4 e P6 não apresentaram citotoxicidade às células nos tempos de 24 e 48 horas, enquanto que os polissacarídeos P3 e P5 apresentaram-se citotóxicos no tempo de 24 horas e o polissacarídeo P3 no tempo de 48 horas. As imagens obtidas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura nos permitem visualizar que as células controle são menores, não apresentam inibição de contato e possuem características de células tumorigênicas; do mesmo modo que as células expostas aos polissacarídeos P1, P5 e P6 apresentam-se maiores, mais espalhadas, mais aderidas e, conseqüentemente, mais estacionárias; e ainda, as células expostas aos polissacarídeos P1, P3 e P5 apresentam morfologia estrelar e expansões celulares de forma arborescente ao redor de todo corpo celular muito proeminentes.

Palavras chave: Câncer. melanoma. linhagem B16F10 (melanoma murino). estudo *in vitro*. polissacarídeos. potencial antitumoral. *Pleurotus*. *Lentinus*. *Agaricus*.

ABSTRACT

Statistics say the second leading cause of death in Brazil since 2003 due to cancer occurs in an overview, this equates to 17% of deaths. This disease is characterized by uncontrolled cell proliferation, cell differentiation and inability invasiveness tissue (metastasis). Melanoma is a very aggressive type of cancer, with a high mortality rate, which has origins in melanocytes that have undergone genotypic changes and / or phenotypic characteristics, due to its high metastatic potential is considered very serious. Because it is a very aggressive cancer, existing therapies that are not very effective in conventional treatments, and they offer many side effects, which are, in most cases, incurable. Although there is a relentless search for better treatments, we observed a limitation of antitumor drugs by their side effects and toxicity of chemotherapy usual. There are reports in the literature that fungi are a source of various bioactive substances, among them we can mention: terpenoids, steroids, proteins, lectins, proteoglycans and polysaccharides in particular, capable of modulating the immune system as well as anti-tumor action, among other performances. Examples of polysaccharides: the manogalactanas, and fucomanogalactanas fucoglucogalactanas. In order to minimize the side effects of standard therapies, we propose this project to investigate the possible anti-tumor potential of 6 different polysaccharides, extracted and isolated the fungi: *Pleurotus*, *Agaricus* and *Lentinus*. Analyzes were carried out *in vitro* with the tumorigenic line B16F10 (murine melanoma). This strain was exposed to various concentrations of polysaccharides in 500µg/mL time curve, and subsequent evaluation of specific dynamic and cellular events were developed in this study, the following tests: cell viability, and cellular cytotoxicity assessment of morphological and ultrastructural induced the action of these different polysaccharides. The paper results show that the polysaccharides P1, P2, P4 and P6 of the cells did not show cytotoxicity at 24 and 48 hours, while the polysaccharides were P3 and P5 are cytotoxic at 24 hours and P3 at the time of polysaccharide 48 hours. The images obtained by Scanning Electron Microscopy allow us to see that the control cells are smaller, they do not exhibit contact inhibition and they have characteristics of tumorigenic cells, the same way that cells exposed to polysaccharides P1, P5 and P6 are presented more expanded, more adherent and therefore more stationary, and also the cells exposed to polysaccharides P1, P3 and P5 have stellar morphology and cellular expansion arborescent shape around the cellular body very prominent.

Keywords: Cancer. melanoma. line B16F10 (murine melanoma). *in vitro* study. polysaccharides. antitumor potential. *Pleurotus*. *Agaricus*. *Lentinus*.

LISTA DE FIGURAS

NÚMERO	DESCRIÇÃO	PÁGINA
FIGURA 1	DADOS DA INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER NO MUNDO.	16
FIGURA 2	INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CÂNCER DE PULMÃO, MAMA, ESTÔMAGO, PRÓSTATA E MELANOMA (MUNDIAL).	16
FIGURA 3	DADOS DA INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER NO BRASIL.	17
FIGURA 4	INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CÂNCER DE MAMA, PRÓSTATA, PULMÃO, ESTÔMAGO E MELANOMA NO BRASIL.	18
FIGURA 5	IMAGEM REPRESENTATIVA DAS CAMADAS DA PELE.	19
FIGURA 6	ANATOMIA DA PELE, MOSTRANDO A EPIDERME, A DERME E OS MELANÓCITOS.	20
FIGURA 7	ESTÁGIO 0 OU <i>in situ</i> DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.	22
FIGURA 8	IMAGEM REPRESENTATIVA DA CIRURGIA DE REMOÇÃO DA ÁREA DE CÉLULAS ANORMAIS E TAMBÉM UMA PEQUENA QUANTIDADE DE TECIDO NORMAL AO SEU REDOR.	23
FIGURA 9	ESTÁGIO 1 DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.	23
FIGURA 10	ESTÁGIO 2 DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.	24
FIGURA 11	BIÓPSIA DO LINFONODO SENTINELA DA PELE.	25
FIGURA 12	ESTÁGIO 3 DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.	26
FIGURA 13	ESTÁGIO 4 DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.	28
FIGURA 14	GRÁFICO MOSTRANDO A INCIDÊNCIA E OS PERCENTUAIS DE MORTALIDADE DO MELANOMA EM VÁRIAS REGIÕES DO MUNDO.	30
FIGURA 15	FASES DA PROGRESSÃO TUMORAL: DO TUMOR PRIMÁRIO ATÉ AS METASTÁSES.	32
FIGURA 16	ILUSTRAÇÃO DO MECANISMO METASTÁTICO.	32
FIGURA 17	<i>Pleurotus eryngii</i> .	43
FIGURA 18	ESTRUTURA QUÍMICA REPRESENTATIVA DA MANOGALACTANA.	44
FIGURA 19	<i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i> .	44
FIGURA 20	ESTRUTURA QUÍMICA DA B-GLUCANA DE <i>P. ostreatus</i> var. <i>florida</i> .	44
FIGURA 21	<i>Pleurotus eryngii</i>	45
FIGURA 22	ESTRUTURA QUÍMICA REPRESENTATIVA DA β -GLUCANA DE <i>P. eryngii</i> .	45
FIGURA 23	<i>Lentinus edodes</i> .	46
FIGURA 24	ESTRUTURA QUÍMICA REPRESENTATIVA DA β -GLUCANA DE <i>L. edodes</i> .	46
FIGURA 25	<i>Lentinus edodes</i>	46
FIGURA 26	ESTRUTURA QUÍMICA REPRESENTATIVA DA	47

NÚMERO	DESCRIÇÃO	PÁGINA
	FUCOMANOGLACTANA DE <i>I. edodes</i> .	
FIGURA 27	<i>Agaricus brasiliensis</i> .	47
FIGURA 28	ESTRUTURA QUÍMICA DA FUCOGALACTANA ISOLADA DE <i>A. brasiliensis</i> .	47
FIGURA 29	IMAGEM DA LINHAGEM CELULAR B16F10 (MELANOMA MURINO).	48
FIGURA 30	CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS P1, P2, P3, P4, P5, P6, NA CONCENTRAÇÃO DE 500 µG/mL POR UM PERÍODO DE TRATAMENTO DE 24H.	55
FIGURA 31	CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS P1, P2, P3, P4, P5 E P6, NA CONCENTRAÇÃO DE 500 µG/mL POR UM PERÍODO DE TRATAMENTO DE 48H.	55
FIGURA 32	ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 CONTROLE.	57
FIGURA 33	ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P1.	57
FIGURA 34	ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P2.	58
FIGURA 35	ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P3.	58
FIGURA 36	ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P5.	59
FIGURA 37	ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P6.	59
FIGURA 38	GRÁFICO DO PERFIL DE MORTE CELULAR PELO MÉTODO 7-AAD.	60
FIGURA 39	GRÁFICO DO PERFIL DE MORTE CELULAR PELO MÉTODO ANEXINA-V	60
FIGURA 40	ANÁLISE MORFOLÓGICA EM MEV DAS CÉLULAS B16-F10 DO GRUPO CONTROLE E EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P1, P2, P3, P5 E P6, APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO NA CONCENTRAÇÃO DE 500 µG/mL.	63

LISTA DE TABELAS

NÚMERO	DESCRIÇÃO	PÁGINA
TABELA 1	PRINCIPAIS TIPOS DE CÂNCER E SEUS PRINCIPAIS ALVOS METASTÁTICOS.	14
TABELA 2	TABELA REPRESENTATIVA DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS CANCERÍGENAS.	21

LISTA DE MATERIAIS

MATERIAL	MARCA	PAÍS
Linhagem B16F10 (melanoma murino)	BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro	Brasil
Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO e Lonza	EUA/Suíça
Tripsina	GIBCO	EUA
SFB (Soro Fetal Bovino)	GIBCO	EUA
NaCl (Cloreto de Sódio)	FMAIA	Brasil
KCl (Cloreto de Potássio)	EMS – Electron Microscopy Sciences	EUA
Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de Sódio)	EMS – Electron Microscopy Sciences	EUA
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio)	EMS – Electron Microscopy Sciences	EUA
Ácido Cacodílico	Sigma	EUA
MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)	Sigma	EUA
DMSO (1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, dimetilsulfóxido)	Sigma	EUA
Álcool Etílico P.A.	Merck	Alemanha
Glutaraldeído	EMS – Electron Microscopy Sciences	EUA
Paraformaldeído	EMS – Electron Microscopy Sciences	EUA
Tetróxido de Ósmio	EMS – Electron Microscopy Sciences	EUA
CaCl ₂ 1Mm	EMS – Electron Microscopy Sciences	EUA
Garrafa de Cultura 25, 50 e 75cm ²	TPP	Suíça
Placas de 24 e 96 wells	TPP	Suíça
Tubos Falcon 15ml e 50ml	TPP	Suíça
Microtubo de centrífuga	Axygen	EUA
Pipetas (5ml, 10ml, 25ml)	Jet-Biofil	Canadá
Ponteiras	Axygen	EUA
Filtros	TPP	Suíça
Membrana de 0,22µm	Millipore	EUA
FacsFlow - Tampão Citômetro	BD Biosciences	EUA
Annexin V-PE Apoptosis Detection kit	BD Biosciences	EUA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	CÂNCER	12
2.1.1	Tecido Epitelial – Pele	18
2.2	MELANOMA	20
2.2.1	Estágios da Progressão do Melanoma	21
2.2.2	Progressão tumoral / Metastáses	31
2.3	GLICOSAMINOGLICANOS (GAGS) / PROTEOGLICANOS (PGS)	33
2.4	POLISSACARÍDEOS	35
3	JUSTIFICATIVA	40
4	OBJETIVOS	42
4.1	OBJETIVO GERAL	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5	MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1	POLISSACARÍDEOS	43
5.2	LINHAGEM E CULTIVO CELULAR	48
5.3	MÉTODOS	49
5.3.1	Ensaio de Citotoxicidade Celular, em presença ou ausência dos diferentes polissacarídeos, na concentração de 500µg/mL em curva de tempo	49
5.3.2	Ensaio de Viabilidade Celular	50
5.3.3	Ensaio para avaliar as alterações morfológicas (Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV) de linhagem B16F10, tratadas na presença ou ausência dos diferentes polissacarídeos, na concentração de 500µg/mL por 24 horas de tratamento	51
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
7	RESULTADOS	54

7.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR, EM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS DIFERENTES POLISSACARÍDEOS, NA CONCENTRAÇÃO DE 500 μ G/ML EM CURVA DE TEMPO.	54
7.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	55
7.3 ENSAIO PARA AVALIAR AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS (MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV) DA LINHAGEM B16F10, TRATADAS EM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS DIFERENTES POLISSACARÍDEOS, NA CONCENTRAÇÃO DE 500 μ G/ML POR 24 HORAS DE TRATAMENTO.....	61
8 DISCUSSÃO.....	65
9 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo empregado para descrever mais de uma centena de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células. Sob intensa ação proliferativa estas células tendem a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) (INCA, 2011). Os tumores são classificados em benignos ou malignos. Nos tumores benignos, diferentemente dos malignos, as células multiplicam-se vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, e não possuem a capacidade invasiva, raramente constituindo um risco à vida (INCA, 2011). Diferentemente, os tumores malignos têm como característica principal alto potencial invasivo; as células possuem capacidade de se desprender do seu local de origem, migrar e adentrar aos vasos sanguíneos e colonizam outros tecidos ou órgãos, caracterizando o processo de metástase (INCA, 2011).

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele maligno que embora só represente 4% dos tipos de câncer dessa natureza, é o mais grave devido à sua alta capacidade de metástase resultando em altos índices de mortalidade. Por ser um câncer muito agressivo, atualmente os tratamentos com quimioterápicos têm sido pouco eficientes além de apresentarem efeitos colaterais severos (GUIMARÃES *et al.*, 2010), fazendo-se necessário o estudo e desenvolvimento de outras formas de tratamento, que diminuam os efeitos colaterais e sejam mais eficazes.

Trabalhos envolvendo a ação antineoplásica de polissacarídeos obtidos de fungos têm sido reportados desde 1957 (OOI E LIU, 2000). Entretanto, os mecanismos da atividade antitumoral destes polímeros ainda não são evidentes, havendo a necessidade de mais estudos.

Diante do exposto o Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados (LIPS) objetiva, através de metodologias científicas, investigar a possível ação anti-tumoral de polissacarídeos extraídos de 3 diferentes gêneros de fungos empregando-se como modelo experimental a linhagem B16F10 (melanoma murino).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

Notavelmente, a mais antiga descrição e tratamento cirúrgico do câncer aconteceu em 1600 a.C. no Egito, onde foram descritos oito casos de tumores que ocorreram na mama e adotou-se como tratamento a cauterização. Hoje, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, com o número de casos aumentando significativamente, devido em parte ao maior índice da expectativa de vida com aumento dos índices do envelhecimento da população global (VISVADER, 2011). Na Europa e na América do Norte, estima-se que, uma em cada quatro pessoas irá morrer de câncer (ALBERTS, et al, 2006).

O câncer é considerado uma doença fundamentalmente genética que se desenvolve pelo acúmulo de mutações que surgem como consequência de mudanças patológicas nas informações contidas no DNA. Essas mutações podem ser causadas por agentes mutagênicos, que incluem radiação ionizante, químicos carcinogênicos ou ainda podem ocorrer espontaneamente como resultado de alterações nos processos de replicação e reparo do DNA. As mutações que levam ao câncer conferem as células mutantes uma vantagem competitiva em relação às células normais, proporcionando-lhes aumento da proliferação e da sobrevivência celular (ALBERTS, et al. 2006). Para que uma célula cancerosa torne-se bem sucedida, deve adquirir diversas características anormais durante seu desenvolvimento, dentre elas: a dependência reduzida dos sinais de outras células para seu crescimento, sobrevivência e divisão, sendo esta característica geralmente associada às mutações nos componentes das vias de sinalização celular; células cancerosas são menos propensas a morrerem por apoptose, devido a mutações nos genes que regulam o mecanismo de morte celular programada; células cancerosas podem se proliferar indefinidamente devido à reativação da produção da enzima telomerase – que mantém o tamanho dos telômeros; apresentam capacidade migratória, invasiva e metastática, pois comumente tem a capacidade de expressar diferentes moléculas de adesão celular as quais quando em células normais estas são responsáveis por manter as células em seu local de origem; e conseguem estas

células tumorais sobrevivem e proliferam em tecidos distintos, formando metastases (ALBERTS, et al. 2006).

Existem muitos tipos de câncer e em cada tecido podem-se originar diversas classes de manifestações oncológicas. A classificação dos processos tumorais se estabelece em função do tecido de que procedem. Existe uma padronização internacional na nomenclatura empregada para os diferentes tumores dependendo do tecido que deu origem a este: se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma, se este tem origem em tecido conjuntivo como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Tanto carcinomas quanto sarcomas são subclassificados conforme o tipo de estrutura que simulam, por exemplo, os adenocarcinomas simulam uma glândula; os osteossarcomas, os ossos; os osteocondromas, as articulações; os linfossarcomas, gânglios linfáticos; os reticulossarcomas, as células reticulares. Existem também as leucemias, que podem ser classificadas em: mielóides, linfóides, eosinofílicas e monocíticas, conforme o tipo de célula sanguínea que é afetada (National Cancer Institute, EUA, 2011; INCA, 2011).

As causas que induzem ao câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2011 e ALBERTS, et al. 2006).

Os tipos mais incidentes de cânceres, com exceção do câncer de pele não melanoma, seriam os de próstata e pulmão, no sexo masculino; mama e colo do útero no sexo feminino. O câncer representa, no Brasil, a segunda maior causa de morte e 17% do total dos óbitos. Esta doença é o ponto final de um longo processo com três fases: iniciação, promoção e progressão, que refletem alterações genéticas acumuladas, que transformam células normais em células neoplásicas (INCA, 2011).

É amplamente aceito que lesões genéticas têm um papel importante na determinação do fenótipo do tumor e após as células adquirirem a lesão genética tem-se início o câncer. A identificação destas populações de células é um ponto crucial que pode permitir uma detecção mais precoce de doenças malignas e uma

melhor previsão do comportamento do tumor, e finalmente pode levar a terapias preventivas para os indivíduos com alto risco de desenvolver câncer (VISVADER, 2011).

Heterogeneidade fenotípica e funcional são características dos cânceres que ocorrem em vários órgãos. A variabilidade pode ocorrer entre os tumores originados no mesmo órgão (heterogeneidade intertumoral), levando a classificação de tumores de distintos subtipos. Estes subtipos são tipicamente caracterizados por seu perfil molecular, juntamente com sua morfologia e expressão de marcadores específicos (como hormônios e receptores de diferentes fatores de crescimento). Variações também ocorrem no interior de cada tumor (heterogeneidade intratumoral), no qual as células do tumor, muitas vezes possuem características distintas devido às diferenças na expressão de marcadores específicos (VISVADER, 2011).

Os tumores ditos benignos não apresentam potencial invasivo ou metastático, ou seja, não possuem capacidade de invadir e colonizar novos órgãos e tecidos, podendo este ser removido cirurgicamente. Diferentemente dos tumores benignos, os chamados tumores malignos possuem alto poder invasivo, o que lhes confere a capacidade de adentrar à corrente sanguínea e vasos linfáticos possibilitando a colonização de outros órgãos e tecidos, formando metástase, sendo estas as características que tornam os tumores malignos tão difíceis de serem erradicados (ALBERTS, et al. 2006).

A tabela a seguir evidência em ordem decrescente da esquerda para a direita, os três locais mais comuns de metástase, excluindo os gânglios linfáticos, para vários tipos de câncer (National Cancer Institute, EUA, 2011).

TABELA 1 - PRINCIPAIS TIPOS DE CÂNCER E SEUS PRINCIPAIS ALVOS METASTÁTICOS.

TIPO DE CÂNCER	PRINCIPAIS ALVOS METASTÁTICOS
Mama	Pulmões, Fígado e Ossos
Cólon	Fígado, Peritônio e Pulmões
Rim	Pulmões, Fígado e Ossos
Pulmão	Glândula Adrenal, Fígado e Pulmão
Melanoma	Pulmões, Pele, Músculos e Fígado
Ovário	Peritônio, Fígado e Pulmões
Pâncreas	Fígado, Pulmões e Peritônio

TIPO DE CÂNCER	PRINCIPAIS ALVOS METASTÁTICOS
Próstata	Ossos, Pulmões e Fígado
Reto	Fígado, Pulmões e Glândula Adrenal
Estômago	Fígado, Peritônio e Pulmões
Tiróide	Pulmões, Fígado e Ossos
Útero	Fígado, Pulmões e Peritônio

FONTE: NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA, (2011)

Diante da enorme dificuldade em se obter a cura do câncer, a prevenção passa a ser de extrema importância e para tanto se faz necessário conhecer os possíveis agentes indutores. Estudos epidemiológicos vêm sendo empregados para identificar fatores que possam estar relacionados com a incidência do câncer, e esses estudos tem mostrado que fatores ambientais estão intimamente ligados com a maioria dos casos de câncer. Um exemplo de causa ambiental de câncer é o fumo, o qual é responsável por quase todos os tipos de câncer de pulmão, inclusive promove aumento da incidência de outros tipos de câncer. O impedimento do uso do tabaco poderia reduzir em aproximadamente 30% as mortes causadas por câncer (ALBERTS, et al. 2006).

O câncer é um grave problema de saúde pública, com aproximadamente 12,7 milhões de casos e cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo (JEMAL et al., 2011). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em um estudo realizado em 2008, dentre os diversos tipos de câncer existentes e que acometem a população mundial, o de maior incidência e taxa de mortalidade é o câncer de pulmão (FIGURAS 1 e 2).

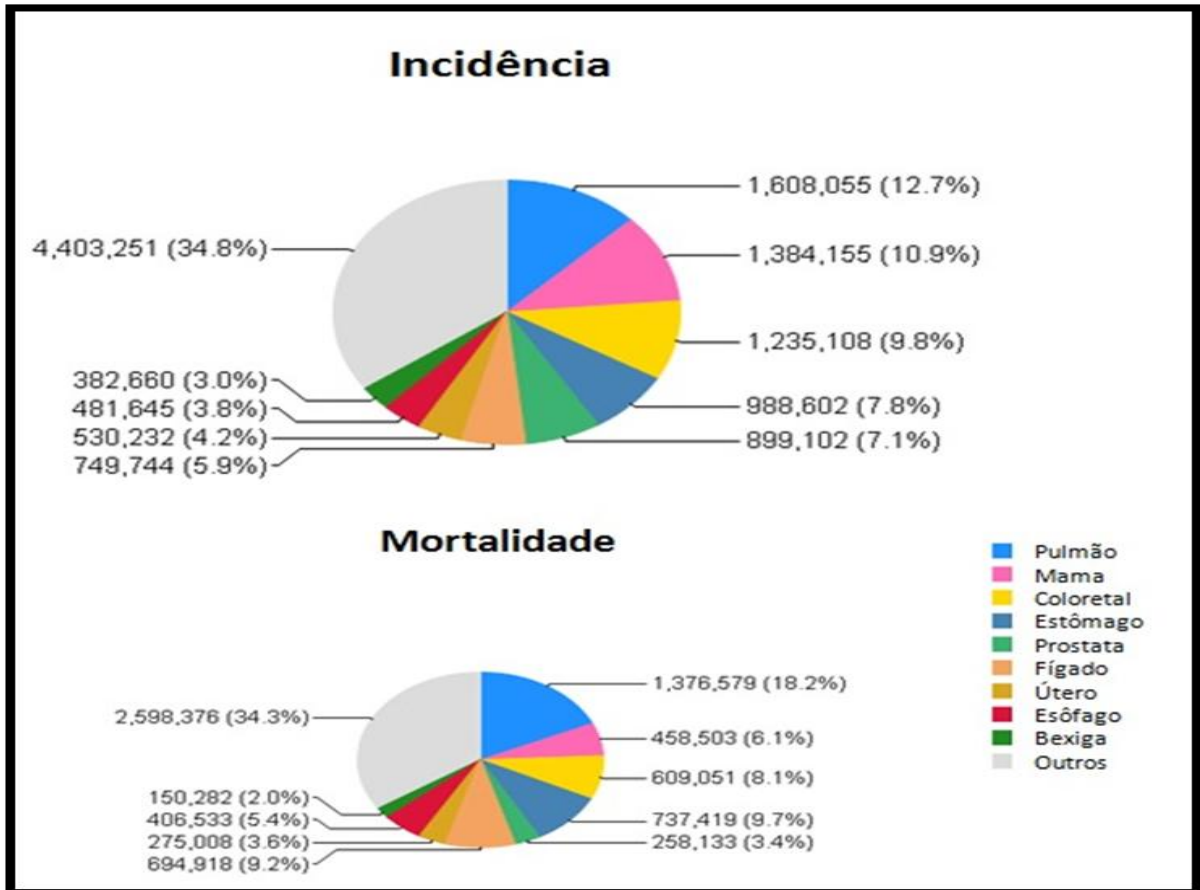


FIGURA 1 - DADOS DA INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER NO MUNDO - FONTE: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2011)

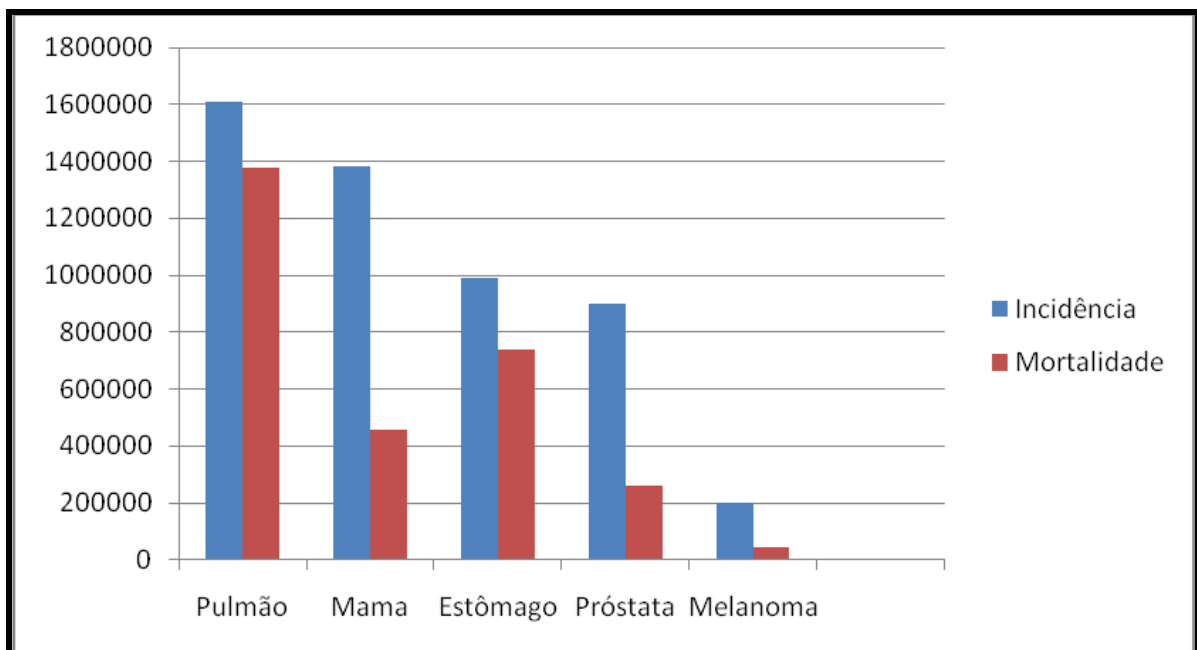


FIGURA 2 - INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CÂNCER DE PULMÃO, MAMA, ESTÔMAGO, PRÓSTATA E MELANOMA (MUNDIAL) - FONTE: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2011)

No Brasil dentre os vários tipos de câncer existentes o de maior incidência é o de mama, seguido pelo câncer de próstata, e os que apresentam a maior taxa de mortalidade são o câncer de pulmão e o de estômago (FIGURAS 3 e 4).

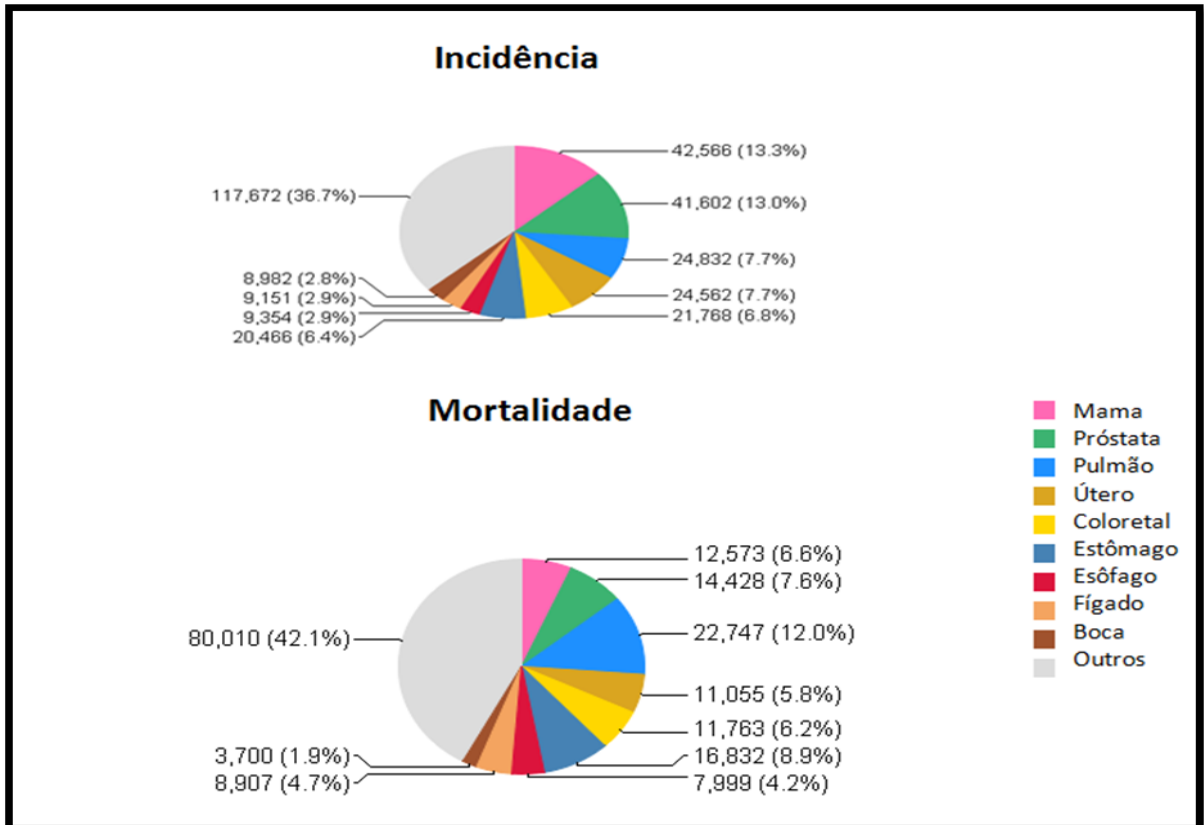


FIGURA 3 - DADOS DA INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER NO BRASIL – FONTE: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2011)

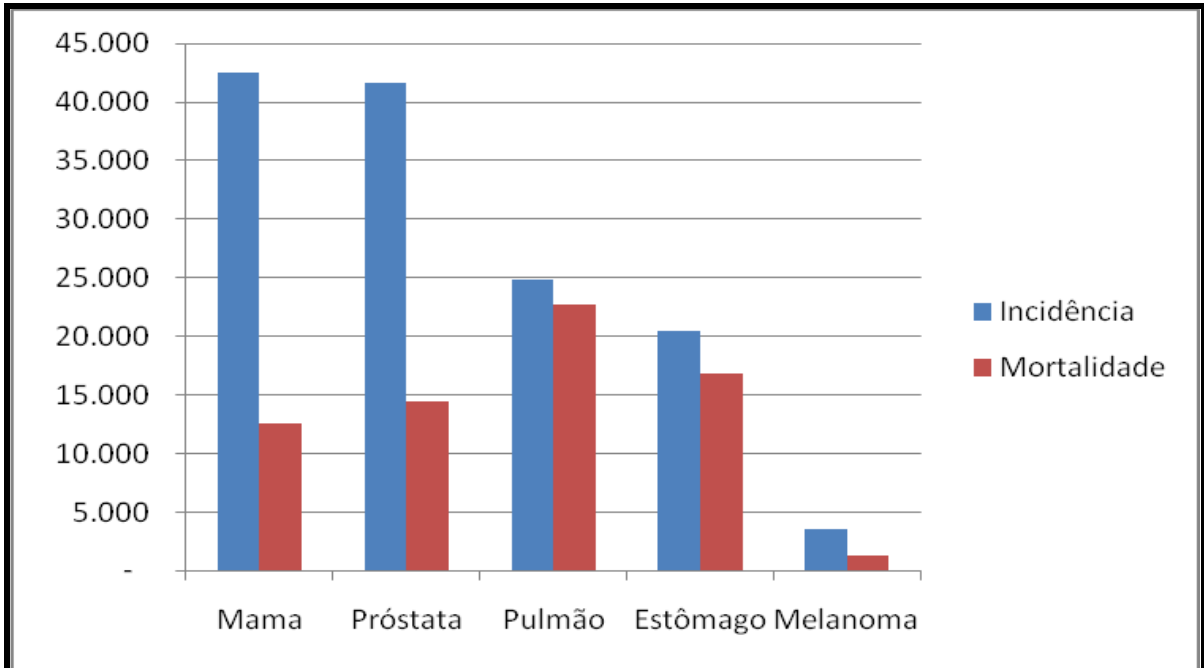


FIGURA 4 - INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CÂNCER DE MAMA, PRÓSTATA, PULMAO, ESTÔMAGO E MELANOMA NO BRASIL – FONTE: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2011)

Dentre os diferentes tipos de câncer que incidem sobre a população mundial, há o melanoma, um câncer com “alto potencial invasivo e metastático”, e que devido a essas características, torna o seu tratamento muito difícil. Cânceres desta natureza são os principais responsáveis pelas mortes em todo o mundo, sendo de grande importância estudos nessa área, sendo este tema o foco desta linha de pesquisa e do presente trabalho científico.

2.1.1 Tecido Epitelial – Pele

A pele é o maior órgão, atingindo 16% do peso corporal e desempenhando múltiplas funções, como proteção contra a perda de água e atrito, participa da termorregulação e também da excreção de várias substâncias. É responsável por recobrir a superfície do corpo, sendo constituída por uma porção epitelial, representada pela epiderme e uma porção conjuntiva, representada pela derme. Abaixo e continuamente a derme, encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (FIGURA 5). A epiderme é constituída pelo epitélio estratificado

pavimentoso queratinizado, sendo abundantes nesse epitélio os queratinócitos. Além dos queratinócitos encontram-se os melanócitos, as células de Langerhans e as de Merkel. Os melanócitos são responsáveis pela produção de um pigmento que é produzido e acumulado na epiderme, a melanina, a qual tem função protetora contra os raios ultravioleta. A derme é o tecido conjuntivo que dá suporte para a epiderme e une à pele a hipoderme. A derme é constituída por duas camadas, a papilar, que é mais superficial e a reticular, mais profunda. Na camada papilar encontram-se fibrilas especiais de colágeno, as quais contribuem para prender a derme à epiderme. Na camada reticular existem muitas fibras do sistema elástico e colágeno, as quais conferem elasticidade a pele, os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos, os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. A hipoderme une a derme aos órgãos subjacentes, ela pode apresentar uma camada variável de tecido adiposo, o qual modela o corpo, funciona como uma reserva de energia e protege contra o frio, visto que a gordura é um bom isolante térmico (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

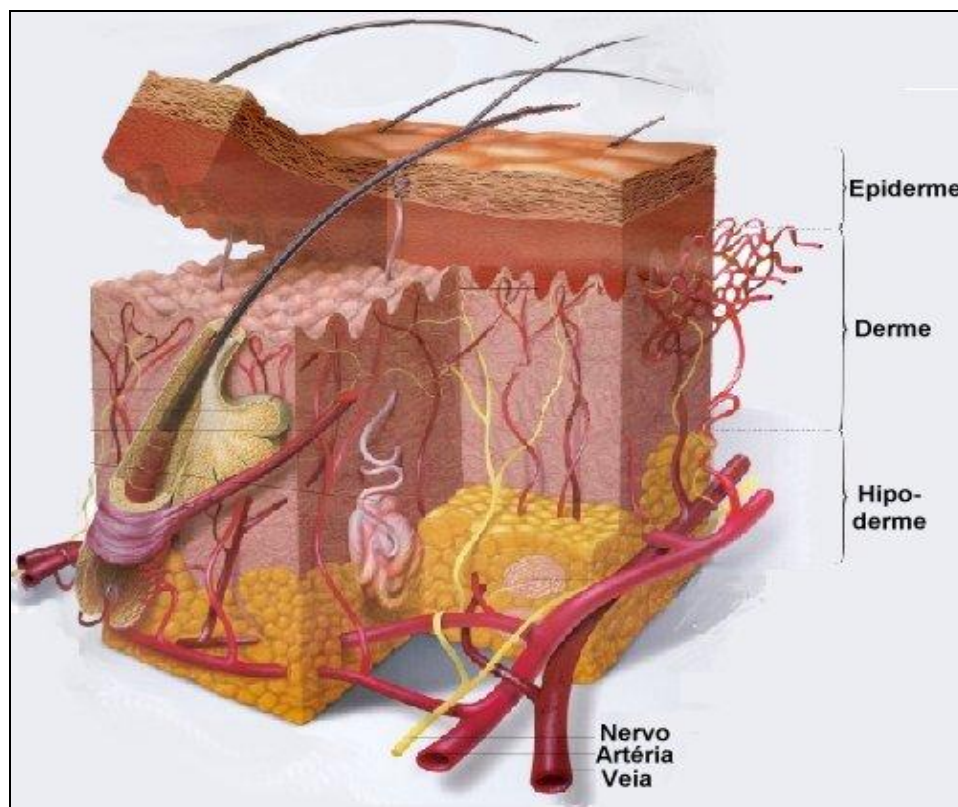


FIGURA 5 - IMAGEM REPRESENTATIVA DAS CAMADAS DA PELE - FONTE: SAUDETOTAL.COM.BR

2.2 MELANOMA

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele maligno que possui origem em melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) as quais para transformarem-se em células tumorigênicas sofreram alterações genóticas e/ou fenotípicas (FIGURA 6). Estas alterações podem ser resultantes do excesso de radiação solar, contato com substâncias cancerígenas (TABELA 2), predisposição genética, ou até mesmo, o aumento da expectativa de vida (TUCCI *et al.*, 2007; JEMAL *et al.*, 2011). O melanoma pode surgir a partir da pele normal ou de uma lesão pigmentada. A manifestação da doença na pele normal se dá a partir do aparecimento de uma pinta escura de bordas irregulares acompanhada de coceira e descamação. Em casos de uma lesão pigmentada pré-existente, ocorre um aumento no tamanho, uma alteração na coloração e na forma da lesão que passa a apresentar bordas irregulares (INCA, 2011).

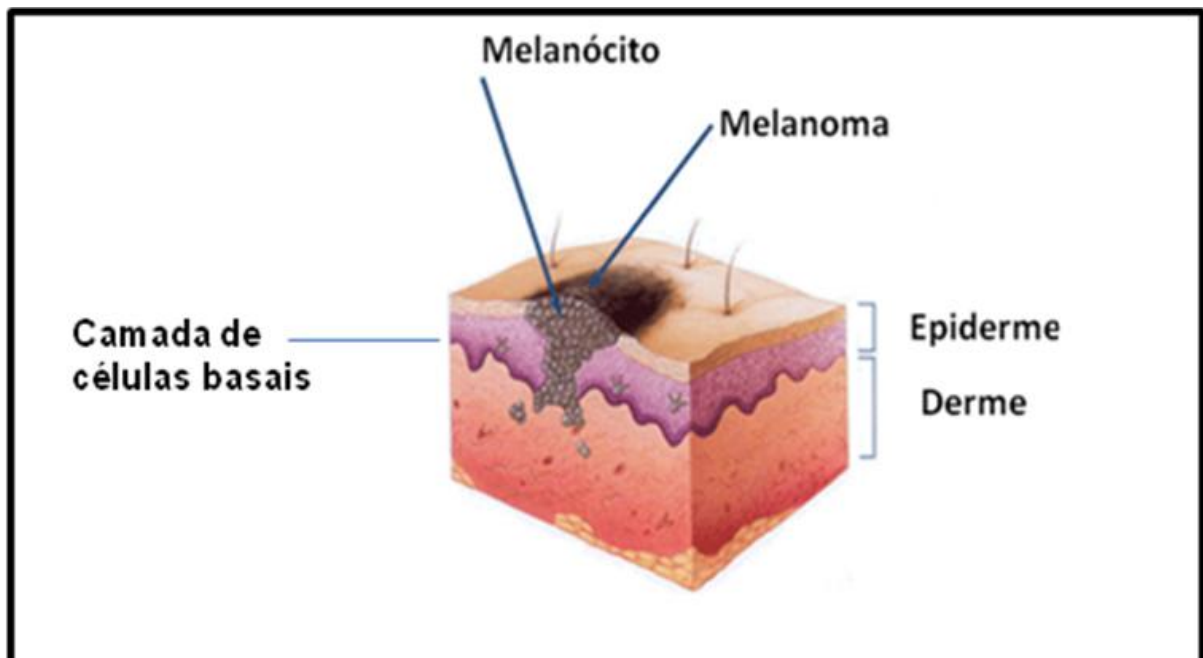


FIGURA 6 - ANATOMIA DA PELE, MOSTRANDO A EPIDERME E A DERMES. MELANÓCITOS ESTÃO NA CAMADA DE CÉLULAS BASAIS, A QUAL É RICA EM CÉLULAS-TRONCO DA EPIDERME E CONSTITUÍDA POR CÉLULAS PRISMÁTICAS OU CUBÓIDES, NA PARTE MAIS PROFUNDA DA EPIDERME - FONTE: ADAPTADO DE O-CANCER-DE-PELE.BLOGSPOT.COM

TABELA 2 - TABELA REPRESENTATIVA DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS CANCERÍGENAS
ALGUMAS SUBSTÂNCIAS CANCERÍGENAS

SUBSTÂNCIA	ÓRGÃO AFETADO
Alcatrão, breu, óleos, resinas, fuligem	Pele, pulmões
Fumo de tabaco	Pulmões, bexiga urinária
Arsênico	Pele
Cromo	Pulmões
Níquel	Pulmões, nariz
Berílio	Pulmões
Ferro	Pulmões
Rádio	Ossos
Pó de diamante	Pulmões, peritônio
Pó radioativo	Pulmões
Aminas aromáticas	Bexiga urinária
Benzol e derivados	Sangue
Cobalto	Pulmões
Amianto	Pulmões

FONTE: ADAPTADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA (2011); INCA, (2011).

Embora só represente 4% dos tipos de câncer de pele, o melanoma cutâneo é o mais grave devido ao seu alto potencial metastático, ou seja, as células de melanoma cutâneo possuem a capacidade de se desprender de seu local de origem, entrar na corrente circulatória e colonizar um novo órgão, particularmente linfonodos, pulmão e cérebro.

2.2.1 Estágios da Progressão do Melanoma

A seguir são mostrados os estágios da progressão do melanoma:

Estágio 0 ou *in situ* da progressão do melanoma.

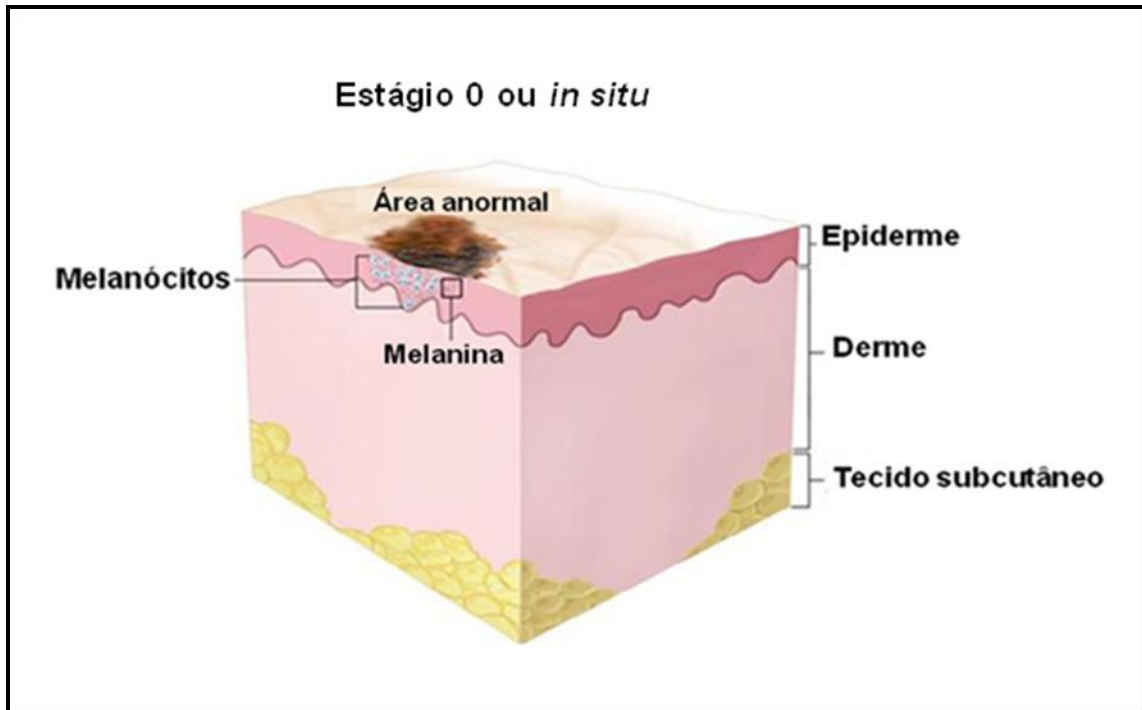


FIGURA 7 - ESTÁGIO 0 OU *IN SITU* DA PROGRESSÃO DO MELANOMA - FONTE: ADAPTADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA (2011).

Nesse estágio os melanócitos anormais são encontrados na epiderme, esses melanócitos podem se tornar câncer e espalhar-se para o tecido normal adjacente. O tratamento do melanoma nesse estágio é geralmente a cirurgia para se remover a área de células anormais e também uma pequena quantidade de tecido normal ao seu redor (FIGURA 8) (National Cancer Institute, EUA, 2011).



FIGURA 8 - IMAGEM REPRESENTATIVA DA CIRURGIA DE REMOÇÃO DA ÁREA DE CÉLULAS ANORMAIS E TAMBÉM UMA PEQUENA QUANTIDADE DE TECIDO NORMAL AO SEU REDOR - FONTE: ADAPTADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA (2011).

Estágio 1 da progressão do melanoma.

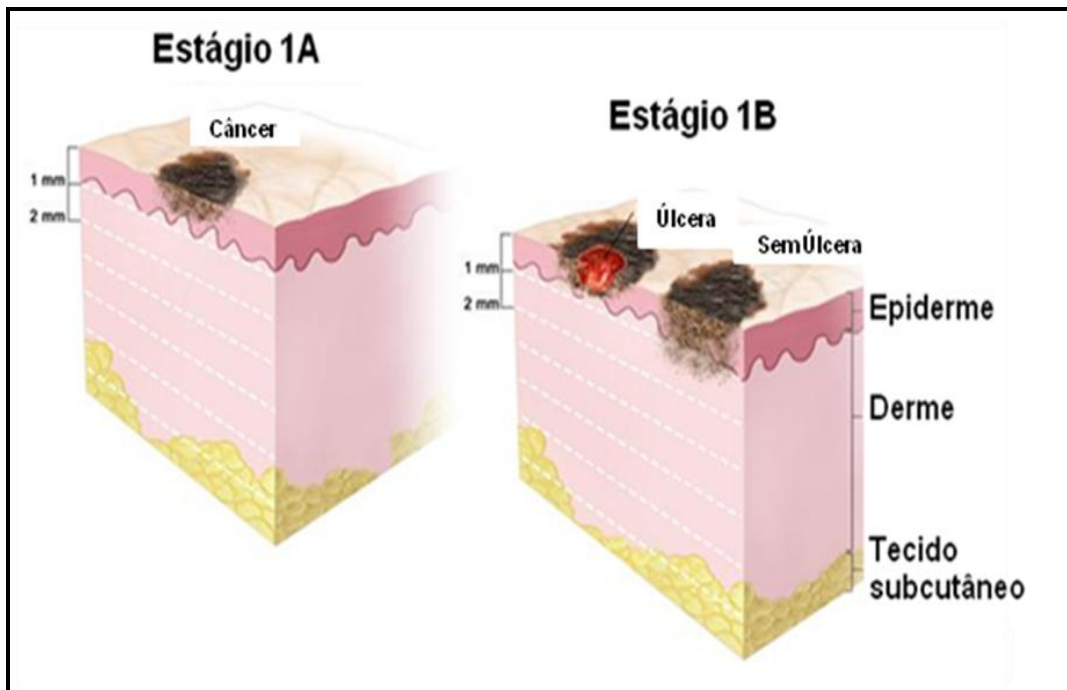


FIGURA 9 - ESTÁGIO 1 DA PROGRESSÃO DO MELANOMA - FONTE: ADAPTADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA, (2011)

No estágio 1A, o tumor não excede mais do que 1 mm de espessura, sem ulceração. No estágio 1B o tumor tem cerca de 1 mm de espessura com ulceração ou entre 1 e 2 mm de espessura sem ulceração. Nesse estágio, o tratamento pode ser feito através da cirurgia para remoção do tumor e uma parte do tecido normal em torno dele com ou sem mapeamento de linfonodo e linfadenectomia (procedimento cirúrgico no qual os nódulos linfáticos são removidos e examinados para diagnosticar a patologia), ou linfadenectomia com ou sem terapia adjuvante. (Um exemplo de terapia adjuvante é a realização da quimioterapia após o procedimento cirúrgico com a finalidade de diminuir o risco de o câncer reincidir) (National Cancer Institute, EUA, 2011).

Estágio 2 da progressão do melanoma.

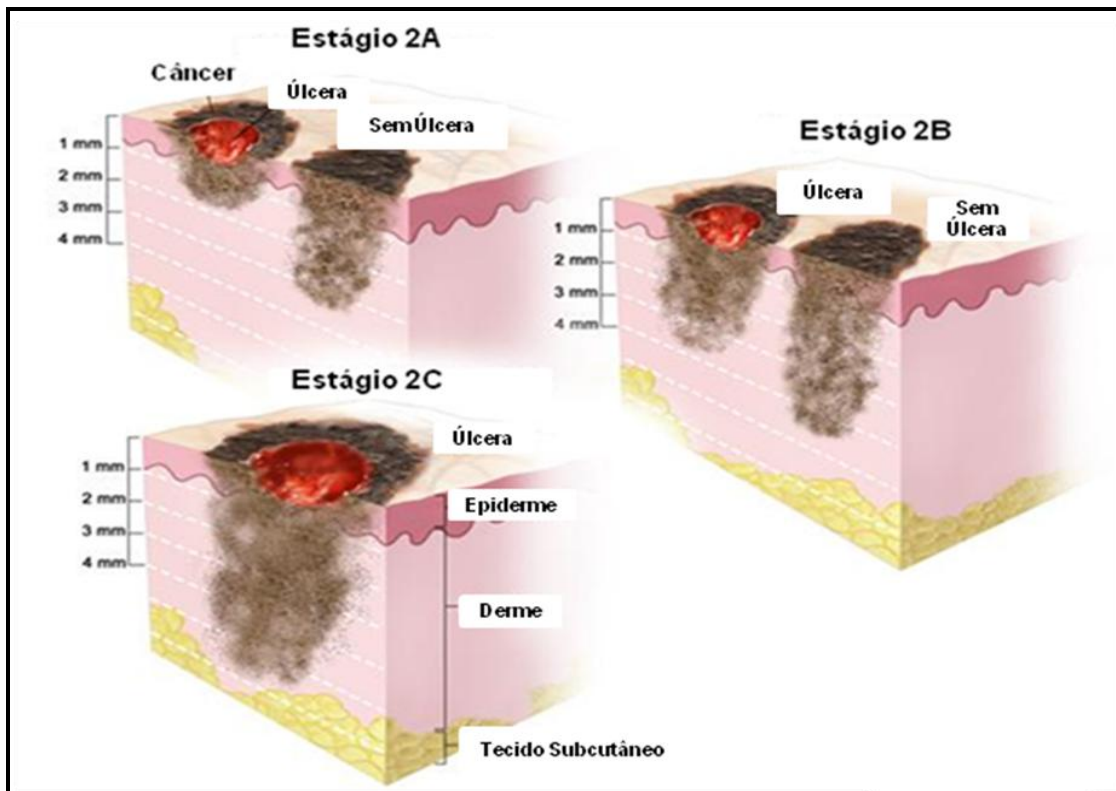


FIGURA 10 - ESTÁGIO 2 DA PROGRESSÃO DO MELANOMA - FONTE: ADAPTADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA (2011)

No estágio 2A, o tumor tem entre 1 e 2 mm de espessura com ulceração ou entre 2 e 4 mm de espessura sem ulceração. No estágio 2B, o tumor tem entre 2 e 4

mm de espessura com ulceração ou tem mais de 4 mm de espessura sem ulceração. No estágio 2C o tumor tem mais de 4 mm de espessura com ulceração. Nesse estágio da progressão do melanoma, o tratamento pode ser feito através da cirurgia para remoção do tumor e uma parte do tecido normal em torno dele, seguida da remoção dos gânglios linfáticos próximos, do mapeamento de linfonodos e biópsia do linfonodo sentinela (o primeiro linfonodo a ser atingido pelo câncer após o seu espalhamento a partir do tumor) (FIGURA 10). Outras formas de tratamento que podem ser realizadas são a terapia biológica após a cirurgia e a quimioterapia adjuvante (National Cancer Institute, EUA, 2011).

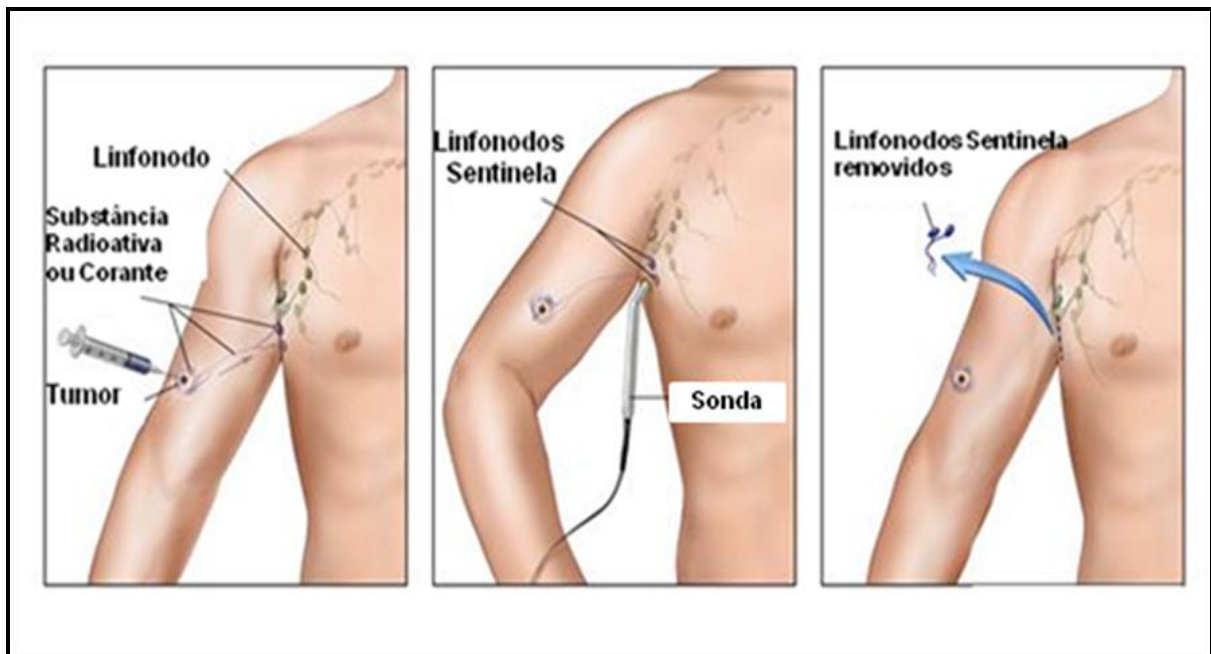


FIGURA 11 - BIÓPSIA DO LINFONODO SENTINELA DA PELE. A SUBSTÂNCIA RADIOATIVA E/OU CORANTE AZUL É INJETADO PRÓXIMO AO TUMOR (PRIMEIRO QUADRO). O MATERIAL INJETADO É DETECTADO VISUALMENTE E/OU COM O AUXÍLIO DE UMA SONDA QUE DETECTA RADIOATIVIDADE (QUADRO DO MEIO). OS LINFONODOS SENTINELA (OS PRIMEIROS LINFONODOS A SEREM ATINGIDOS PELO MATERIAL) SÃO REMOVIDOS E APÓS A REMOÇÃO SÃO ANALISADOS (ÚLTIMO QUADRO) - FONTE: ADAPTADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA (2011)

Estágio 3 da progressão do melanoma.

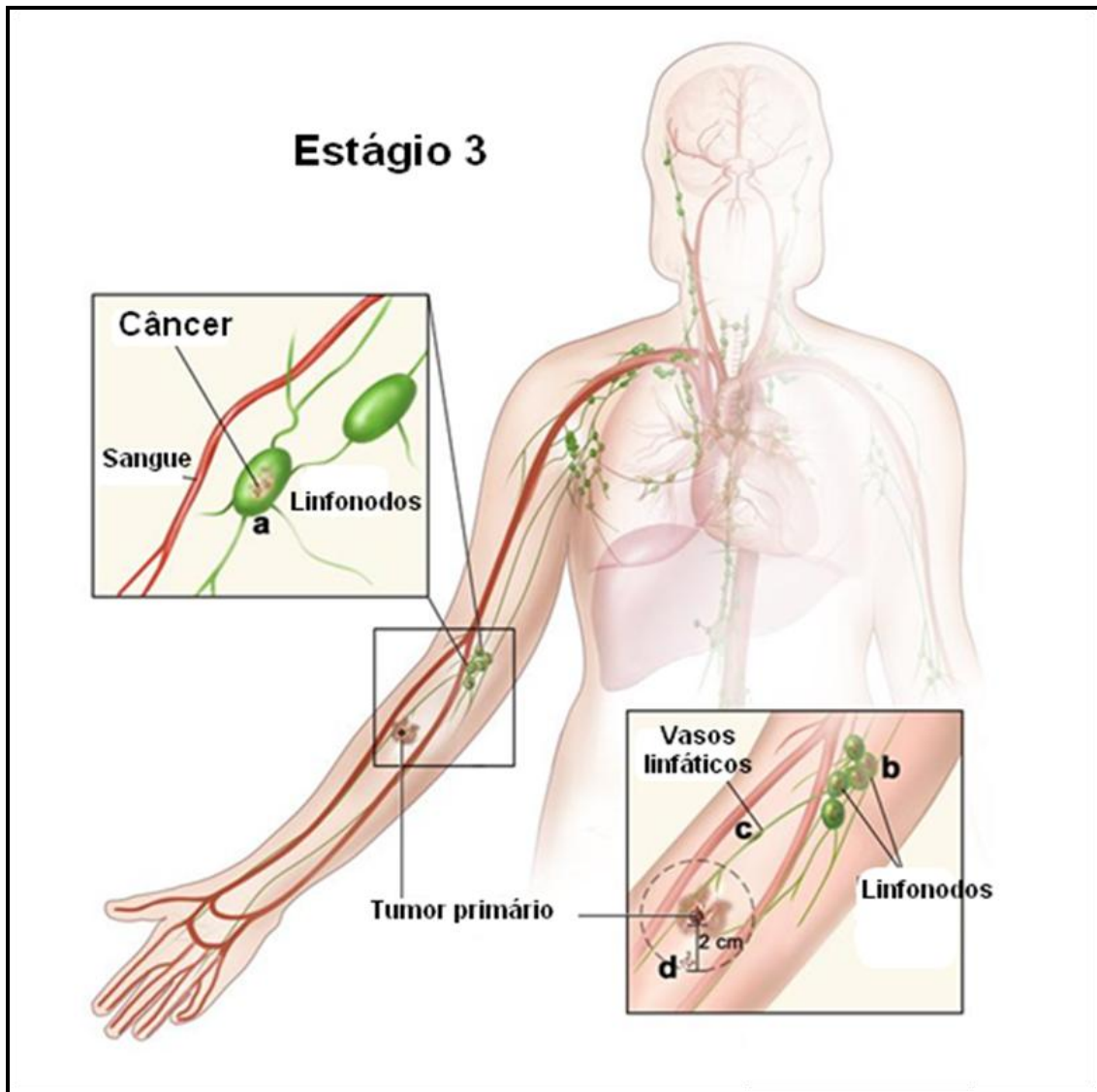


FIGURA 12 - ESTÁGIO 3 DA PROGRESSÃO DO MELANOMA - FONTE: ADAPTADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA (2011)

No estágio 3, o tumor pode ter qualquer espessura, com ou sem ulceração. Em (a), o câncer se espalhou para um ou mais gânglios linfáticos. Em (b), os linfonodos com câncer se agruparam, formando um emaranhado. Em (c), o câncer pode estar em um vaso linfático entre o tumor primário e os linfonodos próximos. Em (d), tumores muito pequenos podem ser encontrados na pele ou sob a mesma, não mais de 2 cm de distância do tumor primário. Nesse estágio do melanoma, os tratamentos utilizados são a cirurgia para remover o tumor e uma parte do tecido normal em torno dele, a cirurgia para remover o tumor com enxerto de pele para cobrir a ferida causada pela cirurgia, cirurgia seguida por terapia biológica e/ou

quimioterapia, quimioimunoterapia e radioterapia (National Cancer Institute, EUA, 2011).

Terapia biológica é o tratamento que utiliza o próprio sistema imunológico do paciente no combate ao câncer, onde substâncias produzidas (interleucina-2) pelos próprios órgãos do paciente são utilizadas para restaurar as defesas naturais do organismo contra o câncer. Este tipo de tratamento é também chamado de bioterapia ou imunoterapia. A quimioterapia é o tratamento que utiliza medicamentos (Dacarbazine (DTIC), Bleomicina, Vincristina, Vinblastina, Cisplatina, Tamoxifeno) na tentativa de cessar o crescimento das células tumorigênicas, matando-as ou impedindo-as de se dividir. A quimioimunoterapia é o tratamento em que se utilizam drogas contra o câncer associado com a terapia biológica. A radioterapia é o tratamento que utiliza a alta energia dos raios-x ou de outros tipos de radiação para matar as células cancerígenas, existindo dois tipos de radioterapia, a externa, onde é usada uma máquina fora do corpo do paciente para emitir a radiação, e a interna, onde uma substância radioativa selada em agulhas, fios ou cateteres é injetada diretamente na área do tumor ou em regiões próximas a ele (National Cancer Institute, EUA, 2011).

Estágio 4 da progressão do melanoma.

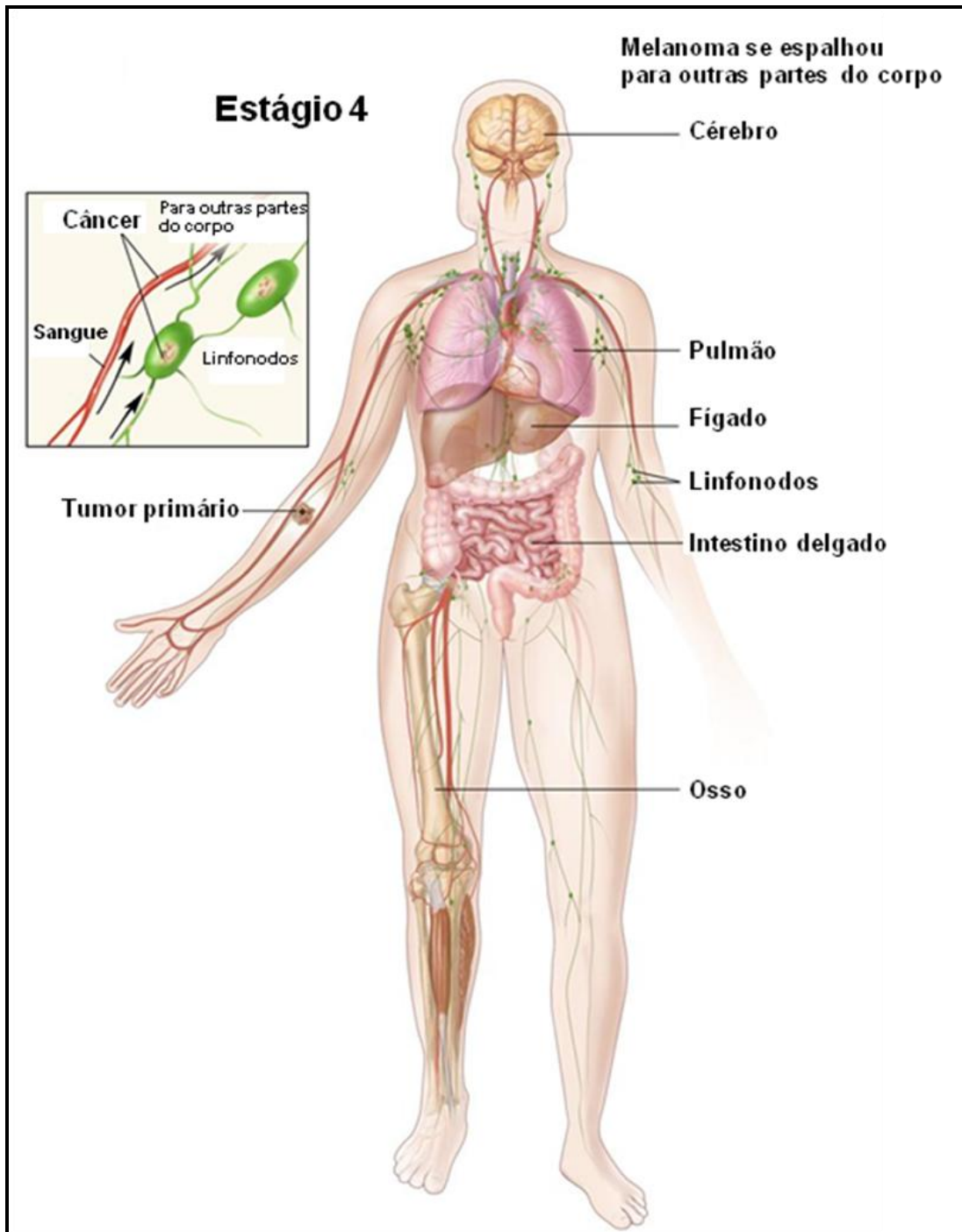


FIGURA 13 - ESTÁGIO 4 DA PROGRESSÃO DO MELANOMA - FONTE: ADAPTADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA (2011)

No estágio 4, o câncer pode se espalhar para outros lugares do corpo, como pulmão, fígado, cérebro, osso, tecidos moles ou do trato gastrointestinal. Nesse estágio da progressão do melanoma, os tratamentos realizados são a cirurgia ou radioterapia como tratamento paliativo para aliviar os sintomas e melhorar a

qualidade de vida, a quimioterapia, terapia biológica, terapia-alvo com anticorpos monoclonais, terapia da vacina (National Cancer Institute, EUA, 2011).

A terapia-alvo é um tipo de tratamento que utiliza drogas ou outras substâncias para identificar e agir especificamente sobre as células tumorigênicas sem prejudicar as células normais. A terapia de anticorpo monoclonal é um tipo de terapia-alvo, na qual são utilizados anticorpos monoclonais produzidos em laboratório, a partir de um único tipo de célula do sistema imunológico. Estes anticorpos são capazes de identificar substâncias presentes em células cancerígenas, as quais auxiliam essas células no seu crescimento, e se ligando a essas substâncias, acabam bloqueando o crescimento das células tumorigênicas ou mesmo impedindo-as de se espalhar para outros locais. Os anticorpos são administrados por infusão, podendo ser utilizados isoladamente ou para transportar drogas ou substâncias radioativas diretamente às células tumorigênicas. Esta terapia pode ser realizada em associação com a quimioterapia como terapia adjuvante. A terapia da vacina é um tipo de terapia biológica, onde são administradas vacinas contendo substâncias anti-tumorais com o intuito de auxiliar o sistema imunológico a reconhecer e atacar tipos específicos de células tumorigênicas. Esta terapia também é considerada como um tipo de terapia-alvo (National Cancer Institute, EUA, 2011).

Incidência e Percentuais de Mortalidade do Melanoma em Índices Mundiais.

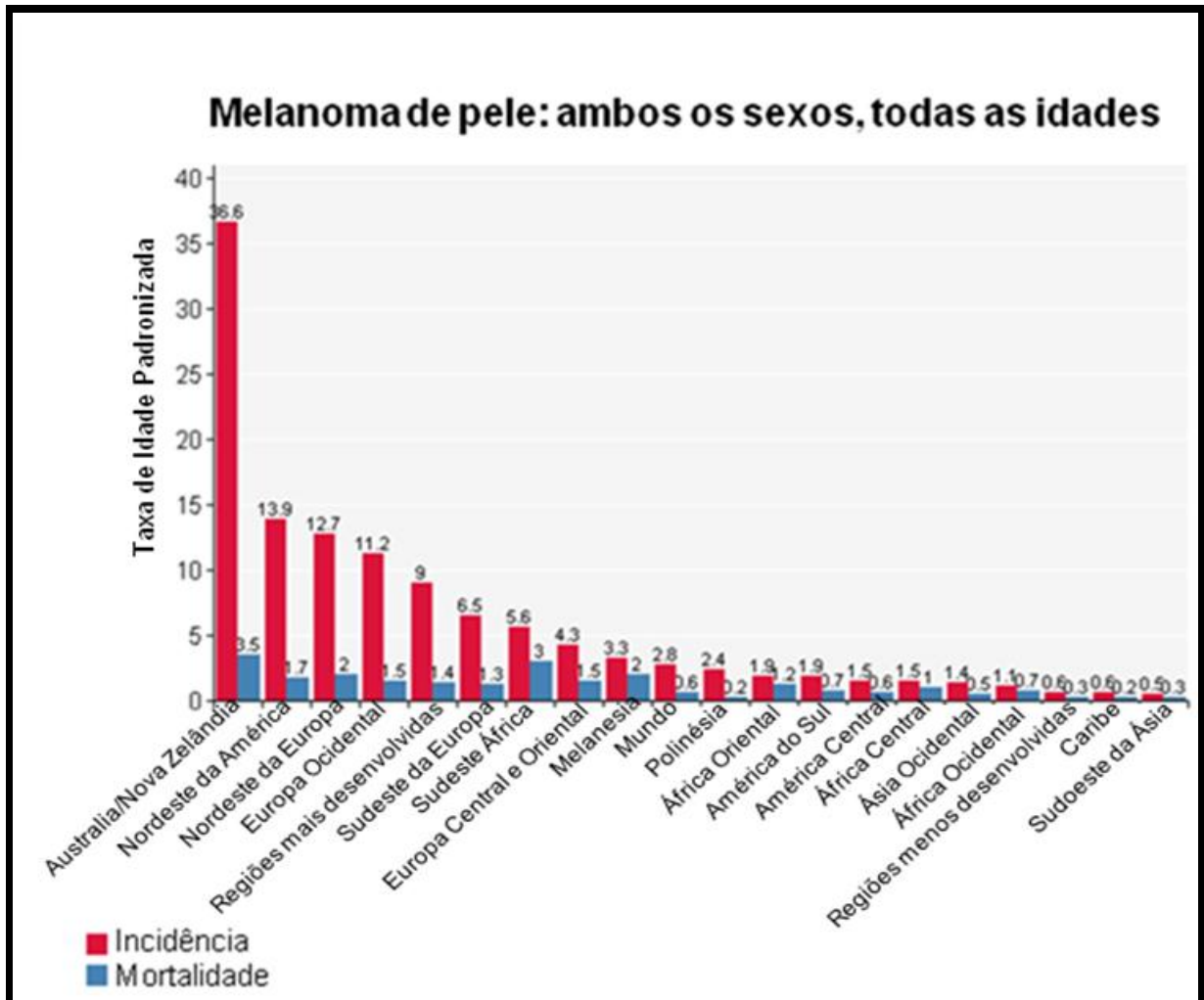


FIGURA 14 - GRÁFICO MOSTRANDO A INCIDÊNCIA E OS PERCENTUAIS DE MORTALIDADE DO MELANOMA EM VÁRIAS REGIÕES DO MUNDO - FONTE: GLOBOCAN 2008 (IARC)(26.5.2011)

Por ser uma forma muito agressiva de câncer, as terapias existentes para o melanoma não tem grande eficácia nos tratamentos convencionais e apresentam muitos efeitos colaterais, sendo na maioria das vezes incurável (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Nestes casos, os tratamentos com quimioterápicos têm sido pouco eficientes e no momento há poucos agentes quimioterápicos para o tratamento de melanoma metastático que ofereçam taxas de resposta maiores que 25%; além disto, estes medicamentos apresentam efeitos colaterais severos. Algumas das drogas utilizadas atualmente no tratamento de melanoma são: Aldesleucina (Proleucina) – também chamada de interleucina 2; Dacarbazine – DTIC Dome e

Ipilimumab – Yervoy (National Cancer Institute, EUA, 2011). Por esta razão, no panorama mundial, aproximadamente 90% das mortes decorrentes de câncer, são devido a casos de cânceres desta natureza (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

2.2.2 Progressão tumoral / Metástases

Para que ocorra a metástase, a célula passa por um processo de transformação, no qual deixa de expressar marcadores de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, como as integrinas E-caderina e a β -catenina e alteração de glicosaminoglicanos. Além de deixar de expressar E-caderina, causando deficiência no ancoramento célula-célula, a célula tumorigênica propicia que a β -catenina permaneça solúvel no citosol, o que resulta em uma estimulação do ciclo celular, gerando aumento da proliferação destas células, induzindo as metástases (GUIMARÃES *et al.*, 2010, TUCCI *et al.*, 2007). Além do número de vasos presentes no tumor, outras propriedades irão determinar a propagação metastática. Atividade proteolítica e migratória, a expressão de moléculas de adesão, a remodelação da matriz extracelular pelas células do estroma e do tumor contribuindo de forma importante para o crescimento do tumor e das taxas de metástases. Moléculas de adesão como caderinas, integrinas e a família das imunoglobulinas são importantes para o crescimento e as metástases do melanoma (LEITER *et al.*, 2004).

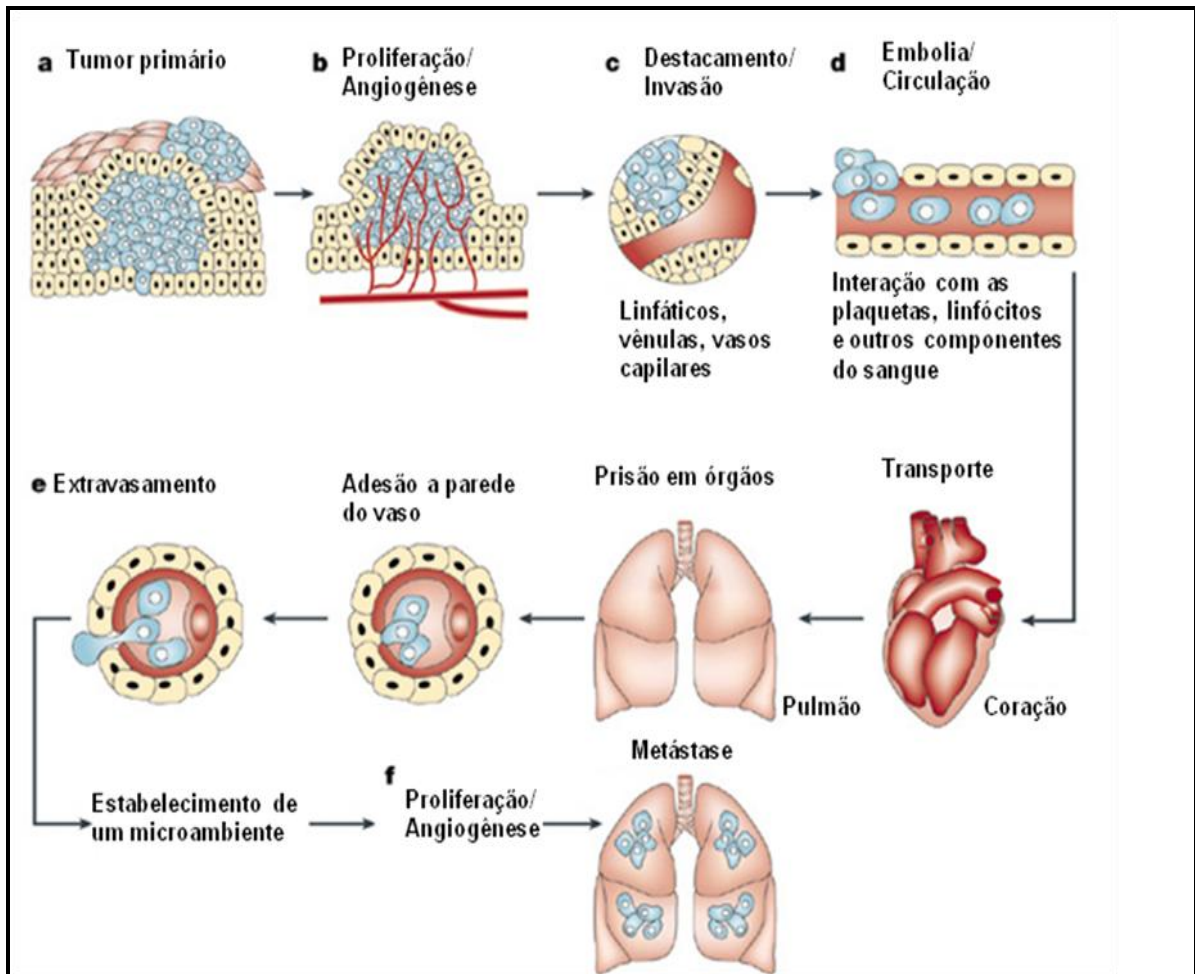


FIGURA 15 - FASES DA PROGRESSÃO TUMORAL: DO TUMOR PRIMÁRIO ATÉ AS METASTÁSES - FONTE: ADAPTADO DE FIDLER, I.J. (2003)

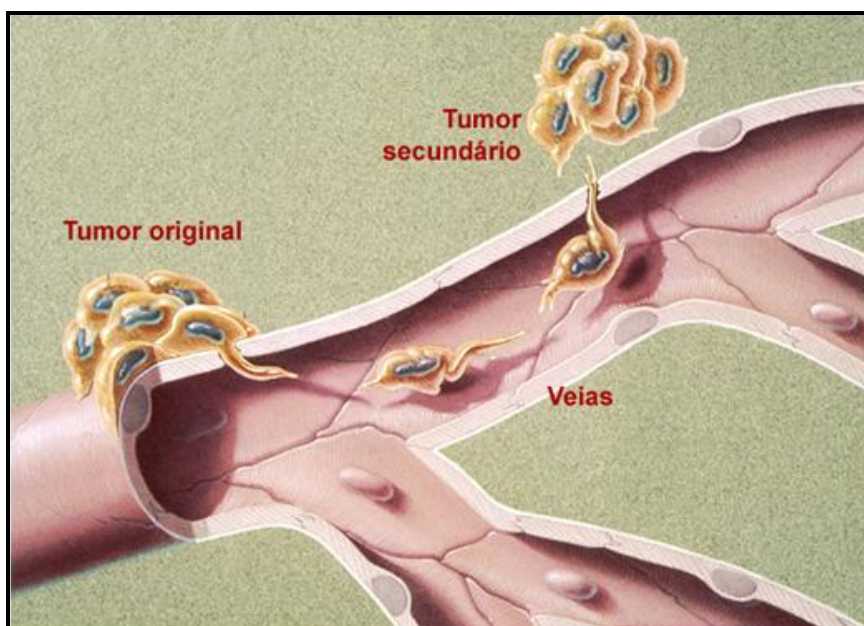


FIGURA 16 - ILUSTRAÇÃO DO MECANISMO METASTÁTICO - FONTE: ADAPTADO DE BIOCARTHAGENES.BLOGSPOT.COM

2.3 GLICOSAMINOGLICANOS (GAGS) / PROTEOGLICANOS (PGS)

Estes compostos foram inicialmente denominados mucopolissacarídeos por MEYER (1938). A denominação glicosaminoglicano foi proposta por JEANLOZ (1960).

Em tecidos de mamíferos ocorrem seis tipos de GAGs: heparina, heparam sulfato, condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico (MATHEWS, 1975; DIETRICH, 1984), definidos com base em seus constituintes. Todos são polímeros de natureza ácida e, com exceção do ácido hialurônico, carregam grupamentos sulfatos, ligados a várias posições. Desta forma, estes devem sua carga negativa a carboxila (ácido hialurônico), a grupamentos sulfatos (queratam sulfato) ou a ambos (condroitim, dermatam e heparam sulfatos e, heparina). Os glicosaminoglicanos, novamente com exceção do ácido hialurônico, ocorrem nos tecidos covalentemente ligados a proteínas, formando os proteoglicanos (PGs). O ácido hialurônico é o único GAG que ocorre nos tecidos, como cadeias polissacarídicas livres (EVERED e WHELAN, 1989).

Os PGs estão envolvidos numa vasta complexidade de eventos, tais como adesão, migração, divisão, diferenciação e ciclo celular (DIETRICH et al, 1977; DIETRICH, 1984; GOSPODAROWICZ et al., 1987; GAMBARINI et al., 1993; PYE et al., 1998; BERNFIELD et al., 1999; GUIMOND e TURNBULL, 1999; DOWD; COONEY; NUGENT, 1999; TUMOVA et al., 2000; NUGENTE e IOZO, 2000; KWAN et al., 2001; PORCIONATTO et al, 1998; 1999; TURNBULL; POWELL; GUIMOND, 2001). É descrito que a ação direta do core protéico, bem como das cadeias de glicosaminoglicanos dos proteoglicanos com proteínas do citoesqueleto e com as moléculas de matriz extracelular influenciam adesão, migração e espraiamento celular (RAPRAEGER e OTT, 1998; WOODS e COUCHMAN, 1992, 1998, 2000; BLOOM; INGHAM; HINES, 1999; SAONCELLA et al., 1999; KUSANO et al., 2000). Ainda, vários trabalhos enfocam em diferentes tecidos e tipos celulares o envolvimento dos PGs, em especial os de heparam sulfato (HS) na tumoregicidade e no aspecto migratório (metastático) das células (HAY, 1981; ADAMS e WATTS, 1993; CALDERWOOD; SHATTIL; GINSBERG, 2000; GIANCOTTI e RUOSLAHTI (1999); BOUDREAU e JONES, 1999; TURNBULL; POWELL; GUIMOND, 2001; WHITTARD e AKIYAMA, 2001). Dados da literatura descritos por KRAEMER e

TOBEY (1972), onde estes autores demonstraram que as células na fase pré-mitótica perdem GAGs de superfície celular. DIETRICH e colaboradores (1980) mostraram uma diminuição significativa do conteúdo de heparam sulfato, em fígado de ratos parcialmente hepatectomizados, onde há intenso estímulo mitótico, proliferativo. Foi observado que células musculares lisas de artérias, em presença de heparina ou de heparam sulfato mostram uma diminuição na proliferação (FILMUS et al., 1995). Recentemente, PORCIONATTO e col. (1998, 1999) mostraram que células endoteliais de aorta perdem o heparam sulfato da superfície celular na fase G₁-S. Estes dados indicam que o heparam sulfato pode modular positiva ou negativamente a proliferação celular dependendo do tipo celular ou do tecido analisado.

Sabe-se que células tratadas com enzimas que degradam heparam sulfato ou sob ação de agentes que interferem na sulfatação deste GAG (como clorato ou selenato), reduzem a proliferação celular (DIETRICH et al., 1987; 1988; LIU et al., 1998; PENC et al., 1998). O mesmo acontece com células de carcinoma, onde a perda de sindecam-1 (família de proteoglicanos constitutivos de membranas celulares) leva a inibição da proliferação (MALI et al., 1994). Sabe-se que proteínas de matriz extracelular têm sido relacionadas na modulação de proliferação, migração e adesão celular. Evidências diretas têm demonstrado que proteoglicanos de heparam sulfato de superfície celular (sindecam-2), participam na formação das fibras de estresse e juntamente com as integrinas ($\alpha_5\beta_1$) atuam na adesão celular sobre uma superfície de fibronectina (KUSANO et al., 2000). ITANO et al. (1996), em estudos realizados em células de carcinoma derivadas do pulmão, demonstraram que os proteoglicanos de heparam sulfato interagem com a fibronectina através de suas cadeias de HS.

Sindecam-4 participa com as integrinas para a formação dos contatos de adesão focais, interagindo com proteínas de matriz, proteínas de membrana e com os constituintes do citoesqueleto sendo importantes nos processos relacionados à adesão e à migração celular (WOODS e COUCHMAN, 1994, 2000; TUMOVA et al., 2000). Células leucêmicas que expressam sindecam-1 não invadem matriz de colágeno Tipo I. Por outro lado, células deficientes na expressão de sindecam-1 são positivas, e quando transfectadas com o cDNA de sindecam-1 passam a exibir uma redução dramática na capacidade de invasão comparada com as células parentais (LIEBERSBACH e SANDERSON, 1994).

Estudos com proteoglicanos integrais de membrana demonstram que alguns destes PGs interagem com o colágeno Tipo VI. Sindecam-1 também interage com colágenos Tipos I, III e V (BERNFELD, 1992). Colágeno Tipo IV inibe a adesão e a proliferação celular de células endoteliais (UNDERWOOD; BEAN; WHITELOCK, 1998).

TERRANOVA et al. (1982, 1984) e GRIMSTAD (1987) demonstraram que as células de melanoma utilizam laminina como proteína de adesão. Quando “in vitro” estas células exibem adesão, invasão e crescimento celular apenas em condições onde a laminina está presente. Células epiteliais sofrem adesão ou migração celular por ação proteolítica do braço γ_2 da laminina 5 na porção N-terminal. O mesmo ocorre com queratinócitos após a ação proteolítica desta molécula ocorrendo aumento na motilidade e na proliferação celular (PALÁCIOS et al., 2001).

Como podemos observar, os diferentes constituintes da matriz extracelular interagem de forma específica com diferentes componentes da membrana plasmática, tais como HSPGs, induzindo as mais variadas respostas nas dinâmicas celulares.

2.4 POLISSACARÍDEOS

Os mecanismos de transformação neoplásica envolvem uma série de eventos genéticos e moleculares que afetam a proliferação e a diferenciação celular. Em vista disso, é razoável postular que as drogas antitumorais dividem-se basicamente em compostos que interferem com o DNA, antibióticos, antimetabólitos, antimitóticos e agentes biológicos. Embora muitos destes fármacos sejam efetivos, a considerável variabilidade entre os pacientes faz com que haja uma grande taxa de insucesso do uso destes fármacos. Aliado a isto, os efeitos colaterais e tóxicos da quimioterapia padrão, limitam muito a utilização de vários compostos, em doses mais concentradas, ou em cursos terapêuticos mais prolongados.

Os cogumelos são conhecidos por seu valor nutritivo e medicinal e também pela diversidade de compostos bioativos que contêm. Entre eles pode-se citar: terpenóides, esteróides, proteínas, lectinas, proteoglicanos e especialmente os polissacarídeos (SANTOS-NEVES et al 2008, SMIDERLE et al 2008). São exemplos

de tais polissacarídeos: as manogalactanas, xilomanas, fucomanogalactanas, fucoglucogalactanas, galactoglucomanas (*Lentinus edodes*), xiloglucanos (*Pleurotus pulmonarius*), manogalactoglucanas, entre outros (SMIDERLE et al 2008). Por séculos os cogumelos têm sido utilizados como agentes terapêuticos e na alimentação, pois têm altos valores nutricionais, sendo ricos em fibra alimentar, minerais e vitaminas. Eles também contêm quantidades significativas de cálcio, ferro, magnésio e fósforo. Recentemente tem sido reportados como fontes de novas drogas, pois alguns de seus componentes podem modular o sistema imunológico e também inibir a atividade tumoral (CARBONERO et al, 2008).

Entre os cogumelos que são amplamente conhecidos por suas propriedades medicinais ou são apreciados no mundo da culinária, estão o *Lentinus edodes*, conhecido popularmente como shiitake, o *Agaricus brasiliensis* e os do gênero *Pleurotus* (CARBONERO et al, 2008). O potencial biotecnológico do gênero *Pleurotus* tem sido explorado por ser uma fonte de moléculas como polissacarídeos, que podem ter capacidade de modular o sistema imunológico; atuar sobre a atividade hipoglicêmica e antitrombótica; diminuir a pressão arterial e o colesterol sanguíneo; apresentar atividade antitumoral, antifúngica; antiviral; anti-inflamatória e antimicrobiana (ZHANG et al., 1994; OOI e LIU, 2000). Esse gênero inclui espécies comestíveis e medicinais, sendo a maioria comercializada na China. Em um estudo realizado com o cogumelo *Pleurotus pulmonarius*, pode se observar que frações de proteínas e polissacarídeos apresentaram atividade anti-tumoral contra Sarcoma 180 implantado em ratos, inibindo quase que totalmente o tumor. Essas frações continham glicose e xilose como principais unidades monossacarídicas (CARBONERO et al, 2008).

Segundo CARBONERO et al 2008, a ação antinoceptiva e anti-inflamatória da fucomanogalactana é devido a uma diminuição na concentração de interleucinas, interferon e fator de necrose tumoral e da inibição de células inflamatórias como linfócitos e macrófagos (CARBONERO et al, 2008). Estudos mostraram que as glucanas são os homopolímeros mais comuns nestes organismos, e que extratos de cogumelos podem suprimir o crescimento tumoral através do controle do sistema imune do hospedeiro. Vários compostos têm sido extraídos de seus basidiocarpos e também do micélio, entre eles polissacarídeos biologicamente ativos como o Lentinan, uma β -glucana muito importante devido ao seu efeito imunomodulador, antitumoral e anti-inflamatório (CARBONERO et al, 2008). No Japão, o Lentinan é

indicado para o tratamento clínico de câncer gástrico e de colorretal, e o seu uso tem resultado no aumento do tempo de sobrevivência de pacientes com câncer gástrico (CHEN e SEVIOUR, 2007). Além disso, outras pesquisas indicaram que a distribuição de unidades glicosil ao longo da cadeia principal confere sua atividade imunomoduladora (SANTOS-NEVES *et al*, 2008).

Entre os polissacarídeos extraídos de cogumelos, existem as β -glucanas, que são a base da estrutura da parede celular de fungos e também conhecidas por terem atividade anti-tumoral, anti-inflamatória, anti-viral, anti-oxidante, hepatoprotetora e imunomoduladora (SMIDERLE *et al*, 2008).

Desde que a sua atividade anti-tumoral foi demonstrada pela primeira vez quase 50 anos atrás, muitos experimentos têm demonstrado notáveis efeitos de certas β -glucanas extraídas de fungos em uma série de tumores (CHEN e SEVIOUR, 2007).

Experimentos *in vitro* mostraram que β -glucanas podem agir diretamente sobre leucócitos, alterando sua atividade fagocitária e citotóxica e influenciar também a produção de moléculas pró-inflamatórias como citocinas e quimiocinas. Alguns resultados mostraram que a β -glucana têm uma atividade semelhante à de drogas não-esteróides anti-inflamatórias e glicocorticóides, sugerindo assim que a β -glucana inibe citocinas pró-inflamatórias, entretanto, mais estudos são necessários para identificação do mecanismo de inibição de inflamação (SMIDERLE *et al*, 2008).

Há indícios que a eficácia destas glucanas está relacionada a presença de ligações β 1-3 ou β 1-6, mas como dito anteriormente, pouco se sabe sobre como as ramificações e outras propriedades químicas e físicas que possam determinar sua eficiência. Algumas β -glucanas estimulam nosso sistema imunológico, nos protegendo de micróbios patogênicos, dos efeitos nocivos das toxinas ambientais e dos carcinogênicos. Certas β -glucanas como zimosan, grifolan e lentinan, podem ativar fagócitos, resultando na eliminação de patógenos por fagocitose. Também têm efeitos sinérgicos com anticorpos monoclonais utilizados no tratamento do câncer. Em um estudo realizado com camundongos onde objetivou analisar a administração via oral de β -glucanas juntamente com a terapia de anticorpo monoclonal resultou na regressão do tumor de neuroblastoma e no aumento da sobrevivência dos camundongos. Outras β -glucanas podem ajudar no tratamento por quimioterapia, pois estas aumentam a tolerância e aceleram a recuperação do paciente em relação aos efeitos tóxicos do tratamento convencional. Em outro estudo realizado, β -

glucanas extraídas do basidiocarpo de *Agaricus blazei* levaram à apoptose ou morte celular programada das células cancerígenas de ovário humano (CHEN e SEVIOUR, 2007).

β -glucanas extraídas de fungos podem exercer múltiplos efeitos em células cancerígenas e até prevenir o câncer, mas seus mecanismos de ação tem se mostrado complexos, pois a regulação das vias de sinalização dos tumores envolvem muitos elementos-chave ainda desconhecidos. A maioria dos estudos realizados com β -glucanas resulta na regressão do tamanho do tumor, mas não na erradicação total, pois tumores que apresentaram regressão, aumentaram rapidamente quando o tratamento com estes polissacarídeos foi interrompido (CHEN e SEVIOUR, 2007).

Alguns autores acreditam que os efeitos anti-tumorais das β -glucanas extraídas de fungos podem estar associados às suas características estruturais, por exemplo, o composto schizophyllan apresentou atividade anti-tumoral contra células tumorais de Sarcoma 180, esse composto possui ligações glucosídicas do tipo β 1-3. Outro estudo sugere que as ligações tipo β 1-6 ligadas às cadeias laterais dos resíduos de glicose aumentam a atividade anti-tumoral. Acredita-se que além das ramificações estruturais, o tamanho da molécula também pode afetar a atividade biológica, por exemplo, para o polissacarídeo scleroglucana, apenas algumas preparações foram eficazes, e o polissacarídeo lentinan apresentou elevada atividade anti-tumoral na sua forma de baixo peso molecular. Outro fator que acredita-se ter influência na atividade anti-tumoral das β - glucanas é a conformação que elas podem adotar. Em solução, onde as ligações de hidrogênio mantêm as cadeias de polímeros juntas, elas podem adotar a conformação de uma ou tripla hélice. Compostos com uma conformação helicoidal tripla são considerados os mais poderosos imunomoduladores, por exemplo, em um estudo realizado com scleroglucana, esta foi biologicamente ativa apenas na sua conformação helicoidal tripla, pois quando sofreu desnaturação teve sua atividade reduzida. Porém, existem dados controversos, pois em um estudo realizado com β - glucanas extraídas de *Glomerella cingulata*, estas se mostraram eficazes contra o crescimento de tumores presentes em ratos, independentemente de sua conformação helicoidal (CHEN e SEVIOUR, 2007).

Alguns autores defendem ainda que os mecanismos de ação desses compostos dependem da sua capacidade de se ligarem a receptores celulares, que

em seguida levam à ativação de várias vias de sinalização que irão promover as respostas imunes nas células afetadas (CHEN e SEVIOUR, 2007).

Os mecanismos da atividade antitumoral destes polímeros ainda não estão claros, entretanto, existem autores que associam essa atividade à ativação do sistema imunológico através da ativação dos macrófagos e do sistema complemento (LIU *et al.*, 1996).

3 JUSTIFICATIVA

Estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2007), do Ministério da Saúde, indicaram que o país teve 472 mil novos casos da doença em 2006, 234 mil entre homens e 238 mil entre mulheres. As regiões de maiores taxas são a Sul e Sudeste e as de menores, Nordeste e Norte, com destaque para o câncer do pulmão. O tabagismo é uma prática responsável por 90% dos casos de câncer de pulmão. Neste contexto, a procura de novas moléculas, novos alvos e novas formulações passam a ser estudo altamente prioritário. A chance de sucesso aumenta a partir de estudos prévios que indicam atividade antiproliferativa e antitumoral *in vitro* ou *in vivo*. Um exame da literatura recente mostra que polissacarídeos de fungos e compostos obtidos de plantas estão entrando na ordem do dia, como possibilidades importantes a serem estudadas (CHEN e SEVIOUR, 2007; HUANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; KOMURA *et al.*, 2010).

O câncer, uma doença de natureza crônica, possui repercussão tanto de ordem econômica quanto social, pois atinge não só o indivíduo mas toda a sua família. Sua evolução exige gastos com a prevenção, o diagnóstico e o tratamento, considerados como custos diretos. Para seu diagnóstico e tratamento são necessárias equipes multidisciplinares altamente especializadas, o emprego de tecnologias sofisticadas e dispendiosas, envolvendo internação hospitalar e acompanhamento ambulatorial frequentes. Como custos indiretos relaciona-se as perdas de produção no trabalho do paciente, devido a morbidade e mortalidade desta doença, a dor e a incapacidade gerada no doente e na sua família (INCA, 2007).

Do ponto de vista da aplicabilidade social, deve-se considerar que o Brasil é o 10^o mercado farmacêutico do mundo em faturamento, com US\$ 4,1 bilhões anuais de arrecadação, estando apenas atrás dos EUA, Japão, alguns países da Europa e México. No entanto, cabe ressaltar que, com exceção do Brasil e México, todos esses países possuem política de desenvolvimento de novos medicamentos e detêm a maioria das patentes do mundo. Esta realidade levou o Brasil a uma dependência muito elevada em áreas sociologicamente sensíveis, como a saúde humana (ROCHA e VIEIRA, 2003). Com vistas a mudar esta realidade, as Universidades representam um papel extremamente importante, pois são Centros de Excelência

para a formação de recursos humanos altamente qualificados na área de pesquisa relacionada ao desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos, podendo gerar produtos inovadores e com a possibilidade de transferência de conhecimentos e produtos gerados, que atendam às necessidades da população.

Por outro lado, o uso de produtos naturais para o tratamento de doenças é associado à medicina popular em todo mundo. Pesquisas realizadas nas Universidades e Institutos de Pesquisa têm revelado substâncias ativas de origem natural com potencial atividade antitumoral, antiviral, analgésica, antioxidante, entre outras. Produtos naturais de plantas, fungos, bactérias e outros microrganismos continuam sendo usados em preparações farmacêuticas na forma de compostos puros ou extratos. Atualmente, estudos epidemiológicos e testes pré-clínicos têm revelado um grande potencial dos compostos naturais no combate do câncer (THANGAPAZHAM *et al.*, 2006). Entre as substâncias de origem natural com potencial aplicação no tratamento do câncer destacam-se os polissacarídeos de origem fúngica.

Estudos vêm demonstrando que a atividade antitumoral de polissacarídeos está relacionada com polissacarídeos constituintes da parede celular do fungo, o β -D-glicano (YOSHIOKA *et al.*, 1985; BURNS *et al.*, 1994; BOCHERS *et al.*, 1999; MIZUNO, 2000; BEROVIC *et al.*, 2003; PRAMANIK *et al.*, 2004; CHEN E SEVIOUR, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* sugerem que o β -D-glicano estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas (IL-4, IL-6, IL-8 e TNF- α). Já, estudos *in vivo* demonstraram que ratos com deficiência de células T, células natural killer ou moléculas específicas como os interferon- α , interleucina-12 (IL-12), TNF- α apresentam alta incidência em tumores em desenvolvimento (FORTES *et al.*, 2006).

Diante dos aspectos descritos anteriormente, a presente monografia acrescida à revisão bibliográfica também objetiva estudar a atividade biológica dos polissacarídeos provenientes dos cultivos de alguns exemplos de fungos dos gêneros: *Pleurotus*, *Lentinus* e *Agaricus*; com enfoque na fração de 500 μ g/mL empregando-se a linhagem tumorigênica B16F10 (melanoma murino).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral de diferentes polissacarídeos, obtidos dos gêneros *Pleurotus*, *Lentinus* e *Agaricus*, na concentração de 500 µg/mL em tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento, empregando ensaios *in vitro* com células de melanoma murino (B16F10).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para efetivar o objetivo geral, foram estipulados os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliação da citotoxicidade, na concentração de 500 µg/mL com curva de tempo (Método MTT) (REILLY *et al.* 1998 com modificações);
2. Avaliação da viabilidade celular através da marcação com Anexina-V e 7-AAD (*kit* comercial Annexin V-PE Apoptosis Detection kit, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).
3. Avaliação das alterações morfológicas (Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV) (FRANCO *et al.*, 2009).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 POLISSACARÍDEOS

Foram empregados nesta monografia, ensaios *in vitro*, através da exposição de células tumorigênicas, tratadas com diferentes polissacarídeos, extraídos de fungos. Estes compostos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcello Iacomini (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná) e pela Profa. Dra. Elaine R. Carbonero (Departamento de Química - Campus Catalão, da Universidade Federal de Goiás). Todo processo de isolamento, purificação e caracterização foram realizadas pelos referidos professores e estes nos foram fornecidos liofilizados.

Os diferentes polissacarídeos avaliados foram:

P1 - MG-Pe: manogalactana parcialmente metilada extraída do basidiomiceto *Pleurotus eryngii*. Este heteropolissacarídeo é composto por manose, galactose e 3-O-metil galactose. Apresenta uma cadeia principal composta por galactose e 3-O-metil galactose, ambas apresentando ligação do tipo alfa-(1,6), as quais podem apresentar-se substituídas em O-2 por beta-manose (FIGURA 18).



FIGURA 17 - *Pleurotus eryngii* – FONTE: MRCASHOP.ORG

P3 - Glc-Pe: Beta-glucana extraída do cogumelo *Pleurotus eryngii*. Este polímero apresenta uma cadeia principal constituída por unidades de β -glucose (1 \rightarrow 3) ligadas [β -Glc p -(1 \rightarrow 3)], sendo parcialmente substituídas em O-6 por cadeias laterais de beta-glucose 1 \rightarrow 6 ligadas (FIGURA 22).



FIGURA 21 - *Pleurotus eryngii* - FONTE: MRCASHOP.ORG

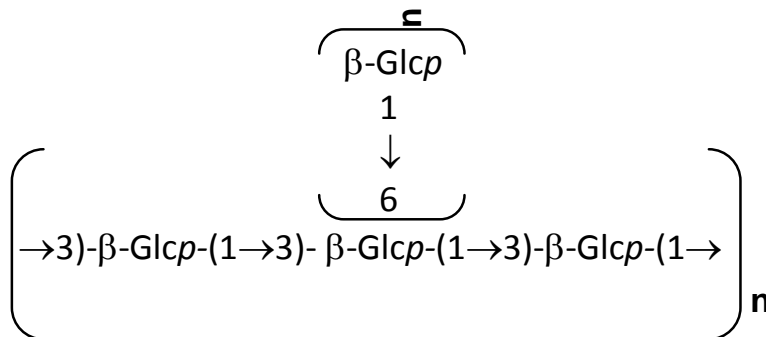


FIGURA 22 - ESTRUTURA QUÍMICA REPRESENTATIVA DA β -GLUCANA DE *P. eryngii*.

P4 - Glc-Le: Beta-glucana isolada de *Lentinus edodes*. Esta glucana apresenta uma cadeia principal constituída por unidades de glucose contendo ligações do tipo beta-(1,6), sendo estas parcialmente substituídas em O-6 por cadeias laterais de glucose Beta-(1,3) ligadas (FIGURA 24).



FIGURA 23 - *Lentinus edodes* - FONTE: WWW.EXTRACTCHINA.COM

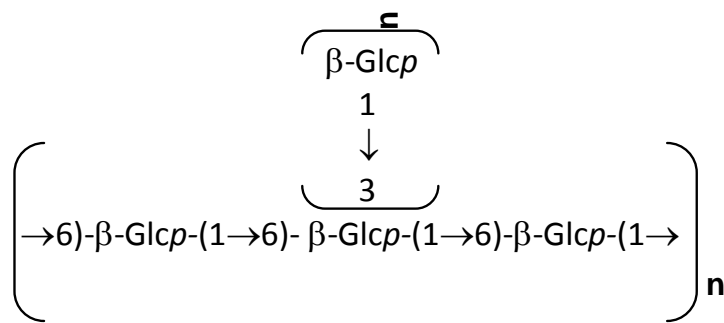


FIGURA 24. ESTRUTURA QUÍMICA REPRESENTATIVA DA β -GLUCANA DE *L. edodes*.

P5 - FMG-Le: Fucomanogalactana isolada de *Lentinus edodes* (Carbonero *et al.*, 2008). Esta heterogalactana, com M_w $16,2 \times 10^3$ g/mol, contém fucose, manose e galactose como constituintes monossacarídeos. A cadeia principal é formada por unidades de alfa-galactose ligadas (1→6), sendo estas parcialmente substituídas em O-2 por terminais não redutores de beta-manose ($\beta\text{-Man}p$) e alfa-fucose ($\alpha\text{-Fuc}p$) (FIGURA 26).



FIGURA 25 - *Lentinus edodes* - FONTE: WWW.EXTRACTCHINA.COM

5.2 LINHAGEM E CULTIVO CELULAR

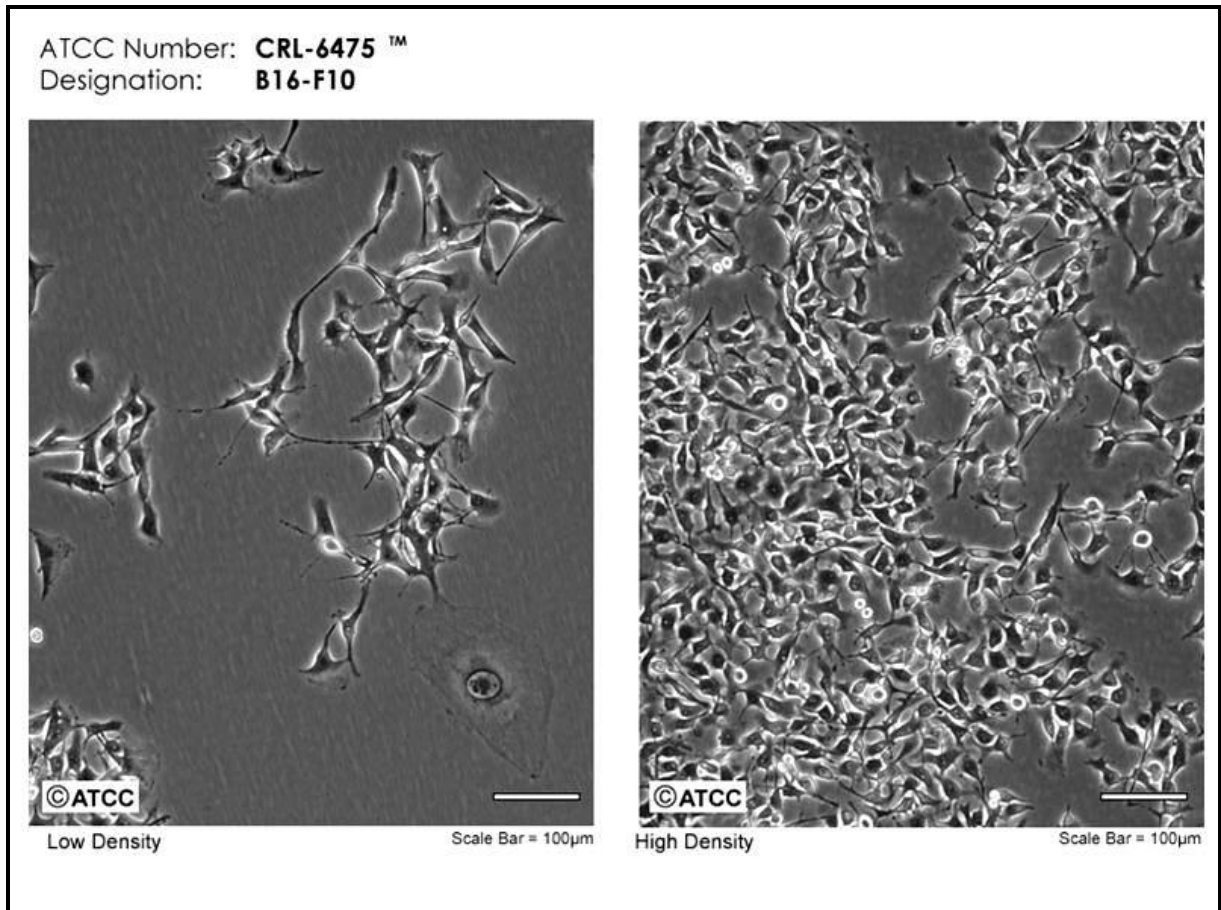


FIGURA 29 - IMAGEM DA LINHAGEM CELULAR B16F10 (MELANOMA MURINO). ESTA LINHAGEM FOI ADQUIRIDA ATRAVÉS DO BCRJ (BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO) - FONTE: ATCC.

A linhagem celular empregada neste estudo foi células de melanoma murino linhagem B16F10 (FIGURA 28), adquiridas através do BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro). Estas células foram cultivadas em garrafas de 25, 50 e 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça), com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - GIBCO, EUA / Lonza, Suíça), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – GIBCO, EUA) acrescido de 0,25 µL/mL de penicilina e 0,25 µL/mL de estreptomicina (GIBCO, EUA), mantidas em incubadora de CO₂ a 37° C, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂. As trocas de meio de cultivo e os subcultivos foram realizados conforme o protocolo padrão a cada 2 a 3 dias. O meio com antibiótico foi esterilizado com membrana de acetato de celulose 0,22 µm, (Millipore, EUA). Dependendo do ensaio

experimental as células foram também cultivadas em placas de cultura de 24 ou 96 poços de poliestireno de 60 x 10 mm ou 35 x 10 mm de diâmetro (TPP, Tradasingen, Suíça). Estoques celulares foram armazenados em frascos de congelamento (TPP, Tradasingen, Suíça) conforme o protocolo padrão e estocados a -128°C (Container de Nitrogênio Líquido). Todos os materiais de vidro utilizados para os procedimentos de cultivo de células foram devidamente esterilizados em autoclave vertical (Phoenix, São Paulo, Brasil) à 120°C , durante 40 minutos, à pressão de 1 atm.

5.3 MÉTODOS

5.3.1 Ensaio de Citotoxicidade Celular, em presença ou ausência dos diferentes polissacarídeos, na concentração de $500\mu\text{g/mL}$ em curva de tempo.

MTT: O método do MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por REILLY et al. (1998) com modificações. As células B16F10 foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços, mantidas em cultura e após foram expostas aos diferentes polissacarídeos na concentração de $500\mu\text{g/mL}$ diluídos em Meio DMEM sem SFB (Soro Fetal Bovino) e filtrados em membrana de $0,22\mu\text{m}$ (Millipore, USA) por 24 e 48 horas de tratamento. Para a análise, as células foram incubadas por 3 h a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 , mais 20 mL de solução de MTT a 500 mg/mL , de modo a obter-se uma concentração final em MTT de 5 mg/mL . A seguir, o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em $0,1\text{ mL}$ de DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm , com filtro de 655 nm como referência, foi realizada em leitor de microplacas (Meridian ELX800, Diagnostic Inc), utilizando-se o solvente DMSO como branco (REILLY et al., 1998). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água que é convertido em cristal de formazan através da clivagem do anel de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase, a qual está presente no interior das mitocôndrias. O cristal de formazan é insolúvel em água e impermeável à membrana das células, e portanto, se acumula nas células saudáveis, podendo ser mensurado.

5.3.2 Ensaio de Viabilidade Celular

Anexina-V e 7-AAD: Este método foi realizado segundo o *kit* comercial (Annexin V-PE Apoptosis Detection kit, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As células B16F10 foram plaqueadas (10^5 /mL) em garrafas de cultura T25 (25 cm², vol. 5mL, TPP, Tradasingen, Suíça) e mantidas por 48 horas à 37° C em atmosfera de 5% CO₂. Após 48 horas o meio de cultura foi aspirado e as células foram expostas aos diferentes polissacarídeos na concentração de 500µg/mL diluídos em Meio DMEM sem SFB e filtrados em membrana de 0,22µm (Millipore,USA). 72 horas após o tratamento com os diferentes polissacarídeos, aspirou-se o meio de cultivo e estas foram lavadas com PBS. Após as células foram desaderidas da garrafa por ação enzimática (1 mL de Tripsina, Gibco, EUA), mantidas na incubadora de CO₂ por cerca de 3 a 5 minutos. Em seguida, as células foram acondicionadas em um tubo Falcon, lavadas duas vezes com PBS. Após as lavagens as células foram ressuspensas em tampão Binding Buffer (2 mL) em tubo para centrífuga cônico (TPP, Tradasingen, Suíça) e contadas em câmara de Neubauer. As células foram aliquotadas em 1×10^6 células por tubo de análise, desta solução foram retirados 100µL para posterior incubação com os marcadores Anexina-V e 7-AAD (Kit BD Biosciences), após 15 minutos de incubação em ambiente escuro, as células foram submetidas a uma análise de 20.000 eventos por amostras em citômetro de fluxo FACSCalibur, através do software CellQuestTM. Para as médias de cada subpopulação celular e a correspondente significância estatística empregou-se (ANOVA unifatorial e teste Tuckey) e estes valores foram tabulados e analisados para cada polissacarídeo. A anexina V é um anticorpo que detecta fosfolipídios de membrana, especificamente a fosfatidilserina. Em células viáveis esse fosfolipídio se encontra restrito na porção interior da membrana plasmática. Nas células em apoptose o fosfolipídio de membrana fosfatidilserina é translocado da porção interior para a porção exterior da membrana plasmática, expondo a fosfatidilserina para o ambiente externo, então a anexina V que é um anticorpo com uma elevada afinidade pela fosfatidilserina se liga as células com este fosfolipídio de membrana exposto. Permitindo então a detecção destas células pelo citômetro de fluxo. A Anexina V

pode ser conjugada com fluorocromos como a ficoeritrina (PE), este conjugado formado (anticorpo anexina acoplado ao fluorocromo) mantém a sua elevada afinidade pela fosfatidilserina e, portanto, serve como uma sonda sensível para análise em citometria de fluxo das células que estão em processo de morte por apoptose. A marcação com Anexina V conjugada com ficoeritrina (PE) é tipicamente usada em conjunto com um corante vital, como o 7-Amino-actinomicina (7-AAD) para permitir a identificação precoce de células mortas por necrose. O composto 7-AAD é um intercalante de DNA, fluorescente, que só se intercala ao DNA de células que perderam a integridade da membrana, sendo detectado somente em células não viáveis ou em necrose (morte celular).

5.3.3 Ensaio para avaliar as alterações morfológicas (Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV) de linhagem B16F10, tratadas na presença ou ausência dos diferentes polissacarídeos, na concentração de 500µg/mL por 24 horas de tratamento.

Análise morfológica em microscopia eletrônica de varredura (MEV):

Para esta análise, as células B16F10 foram cultivadas de acordo com o item 5.2. Após atingirem a confluência celular, estas foram soltas por ação enzimática com tripsina (GIBCO, EUA) por 3 minutos, contadas em Câmara de Neubauer, e plaqueadas cerca de 1.000 células por poço em placas de 24 poços, sobre lamínulas esterilizadas (13 mm de diâmetro). As células plaqueadas foram mantidas em cultura por cinco dias. Posteriormente foram expostas aos diferentes polissacarídeos na concentração de 500µg/mL, por 24 horas. Após a exposição aos polissacarídeos, as células foram lavadas quatro vezes em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4 a 4°C. Fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2,0%, paraformaldeído 4,0%, CaCl₂ 1mM em tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4) por 1 hora, lavadas em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4, pós-fixadas com tetróxido de ósmio (Tetróxido de Ósmio 1%, em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4) por 1 hora à temperatura ambiente, após a pós-fixação, as células foram novamente lavadas em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4. Posteriormente foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (PA, Merck), (30%, 50%, 70%, 90% duas vezes, 100%), por um período de 10 minutos em cada

concentração. Após a desidratação, foram submetidas ao ponto crítico no aparelho (CPD- Balzers Union/ Baltec, Alemanha), metalizadas com ouro no aparelho (CPD- Balzers Union, Alemanha), sendo, posteriormente, analisadas no microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM – 6360LV, Japão) no CME – Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados ao menos três vezes e em triplicata, e então submetidos à análise de variância (ANOVA) fator único e pós-teste de Tukey para determinar significância à *P < 0.05 e **P < 0.01.

7 RESULTADOS

7.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR, EM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS DIFERENTES POLISSACARÍDEOS, NA CONCENTRAÇÃO DE 500 μ G/mL EM CURVA DE TEMPO.

Método do MTT: Este método consiste em evidenciar o metabolismo mitocondrial, no qual as redutases mitocondriais, nas mitocôndrias das células vivas, reduzem o anel tetrazólio do MTT a cristais roxos de formazan púrpura. Assim podemos avaliar a viabilidade celular pela capacidade das mitocôndrias em reduzir o anel a cristais. A solubilização dos cristais, pelo DMSO (dimetil-sufóxido), gera uma solução colorida que pode ser quantificada. O aumento da intensidade da cor (absorbância) é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

As células tumorigênicas B16F10, foram expostas aos diferentes polissacarídeos: P1, P2, P3, P4, P5 e P6, e incubadas na concentração de 500 μ g/mL por um período de tratamento de 24h e 48 h.

Os nossos resultados apresentados (FIGURA 30, 24 horas), (FIGURA 31, 48 horas) demonstraram que os polissacarídeos P1, P2, e P4 não apresentaram citotoxicidade por este método de análise. Os demais polissacarídeos (P3, P5), por este método empregado demonstraram ser mais citotóxicos no tempo de tratamento de 24h. Dessa forma evidencia que as células B16F10, ao longo do tempo expostas a estes compostos, que agem na homeostase celular (citotoxicidade), procuram de alguma forma se adaptar celularmente e reestabelecer a sua viabilidade, muito provavelmente tentando se livrar do composto, talvez estes possam estar realizando um mecanismo de degradação dos referidos polissacarídeos. Somente o polissacarídeo P3 e P5 aparentemente com esta técnica apresentaram citotoxicidade.

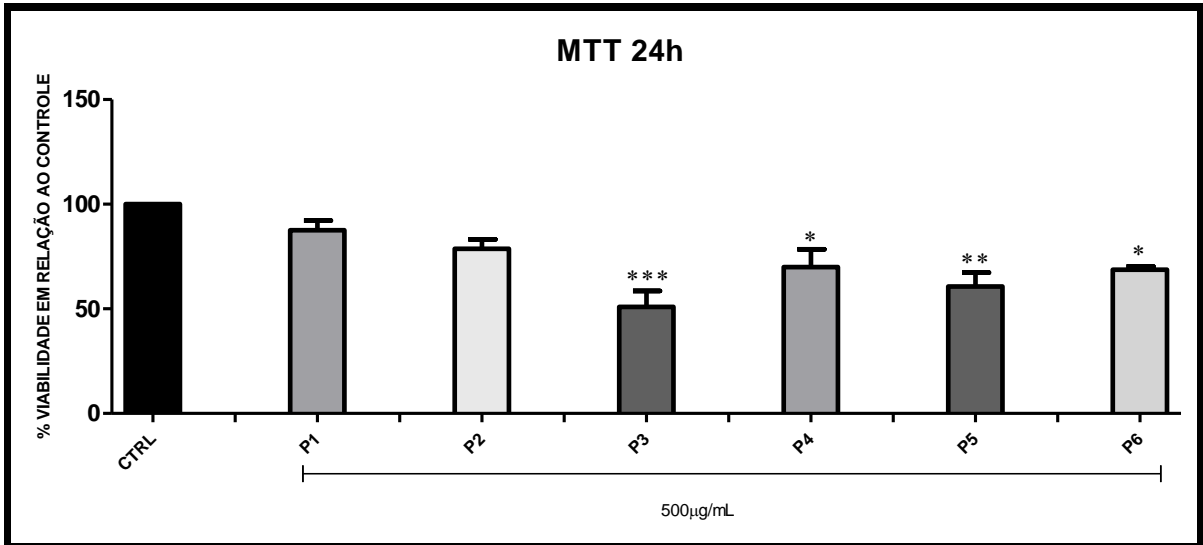


FIGURA 30 - CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS P1, P2, P3, P4, P5, P6, NA CONCENTRAÇÃO DE 500 µg/mL POR UM PERÍODO DE TRATAMENTO DE 24H.

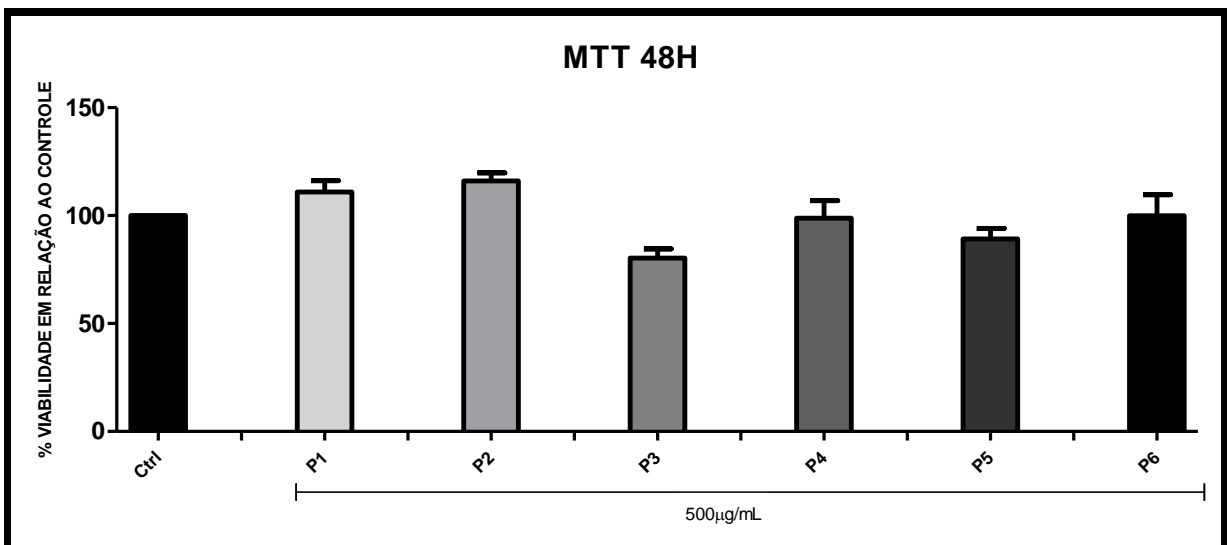


FIGURA 31 - CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS P1, P2, P3, P4, P5 E P6, NA CONCENTRAÇÃO DE 500 µg/mL POR UM PERÍODO DE TRATAMENTO DE 48H.

7.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Anexina-V e 7-AAD: Neste ensaio foi possível avaliar por citometria de fluxo, as populações celulares que apresentaram marcação para o anticorpo Anexina-V conjugada com PE, indicando células que entraram em processo de apoptose. Este anticorpo tem afinidade para fosfolipídios de superfície celular que

contenham carga negativa, sendo mais específico para a fosfatidilserina do que para os demais fosfolipídios. Em células que entram em processo de apoptose, acontece um “flip-flop” deste fosfolipídio de membrana translocando este lipídeo a fosfatidilserina para a monocamada externa da membrana, em células viáveis este está sempre voltado para a porção citosólica da membrana. Simultaneamente com a marcação de Anexina-V, realizou-se uma incubação com o intercalante de DNA 7-AAD, o qual se liga ao DNA e fluoresce. Assim em células com comprometimento de membrana, o 7-AAD penetra na célula e alcança o DNA, sinalizando um processo de morte por necrose celular.

As células tumorigênicas B16F10, foram expostas aos diferentes polissacarídeos na concentração de 500 µg/mL por um período de tratamento de 72h. No gráfico podemos observar que as células controle, que não foram expostas aos polissacarídeos, demonstram um percentual de apoptose. Contudo neste mesmo gráfico pode-se observar que a exposição aos diferentes polissacarídeos não ocorreu uma variação neste percentual, mantendo o grau de morte celular para as células controles superior ao encontrado para as células expostas aos diferentes polissacarídeos.

Devido a variações na metodologia, vamos refazer este experimento para que possamos avaliar as marcações simultâneas, para um resultado mais confiável. Os resultados abaixo não condizem com os achados da literatura. Estes resultados de níveis de morte superior para o controle quando comparado com as células tratadas nos dá a entender que estes polissacarídeos estão induzindo proliferação celular.

Anexina-V e 7-AAD

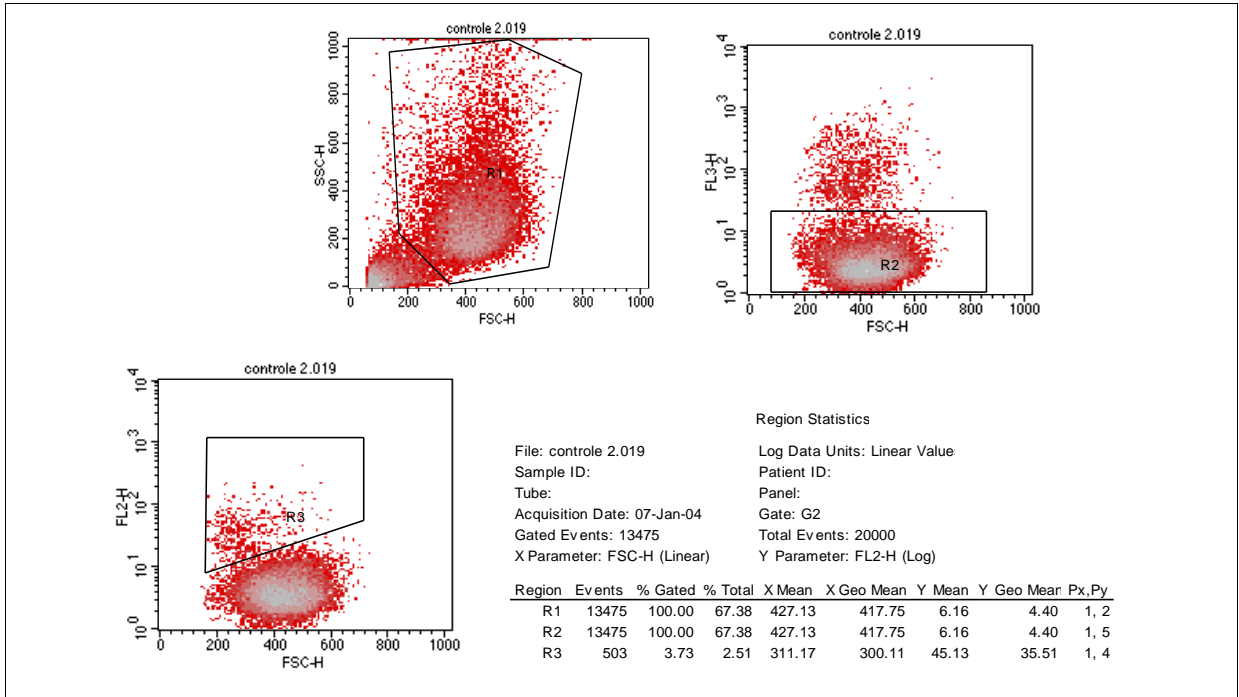


FIGURA 32 - ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 CONTROLE.

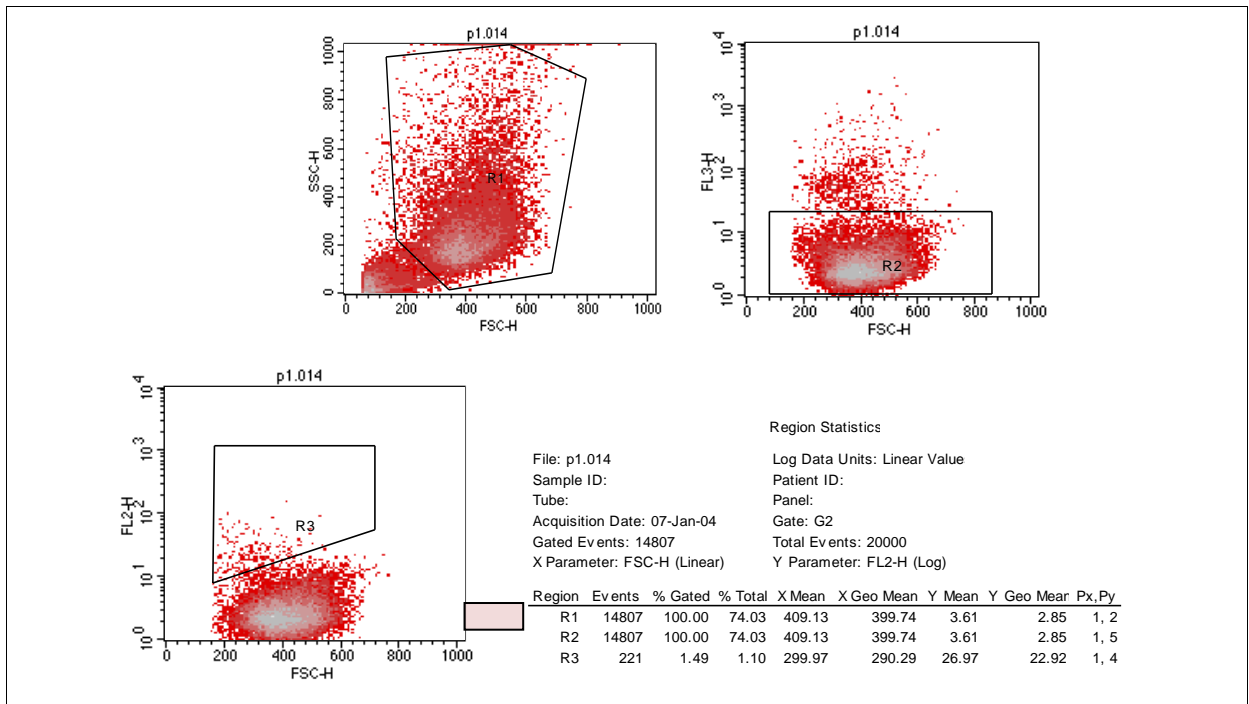


FIGURA 33 - ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P1.

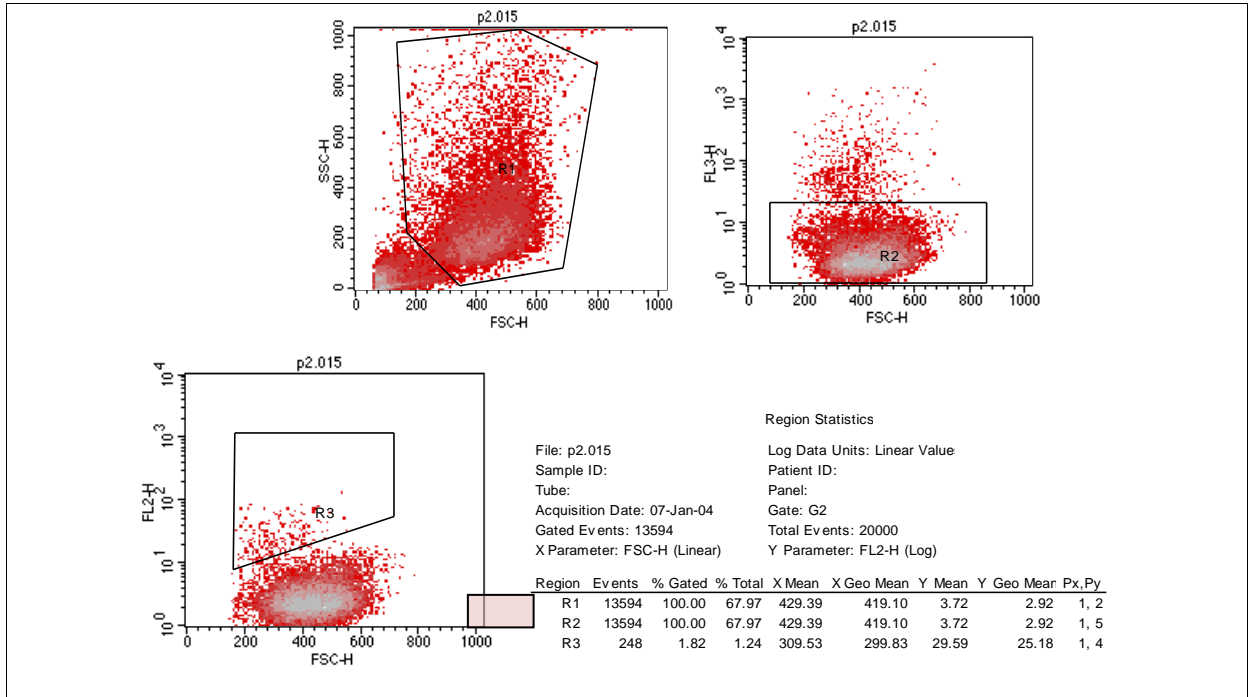


FIGURA 34 - ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P2.

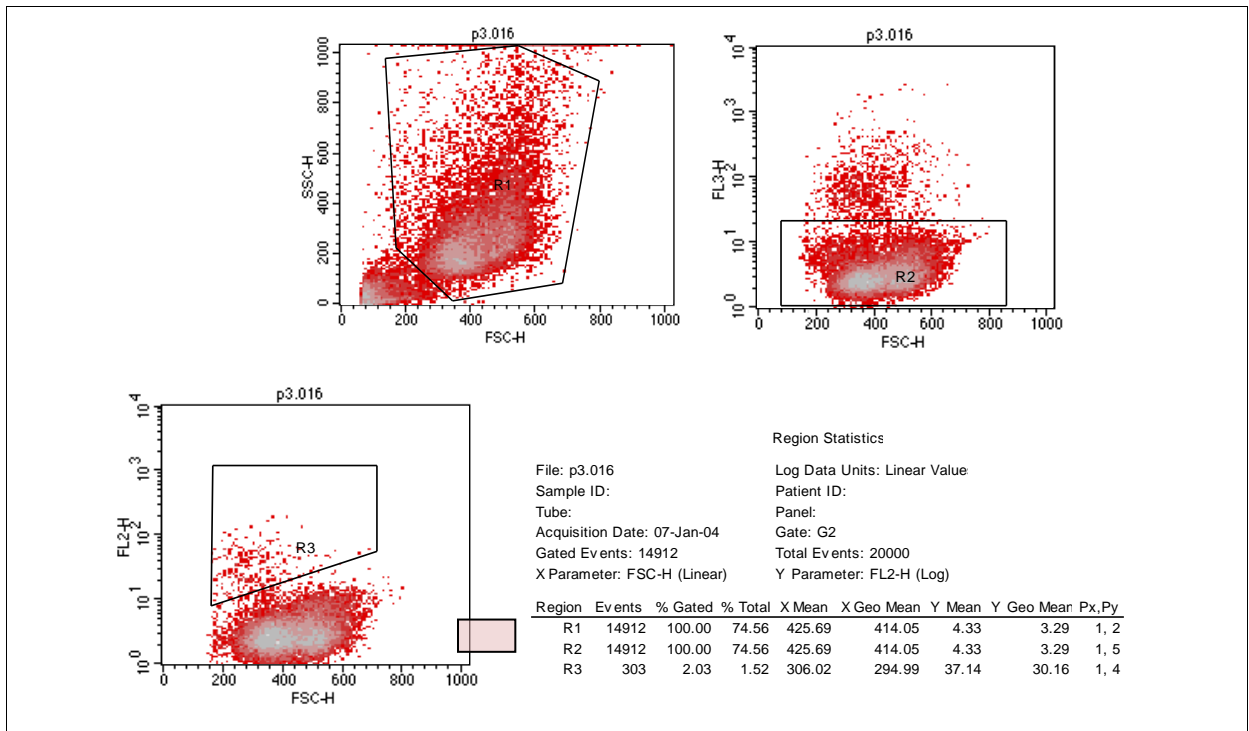


FIGURA 35 - ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P3.

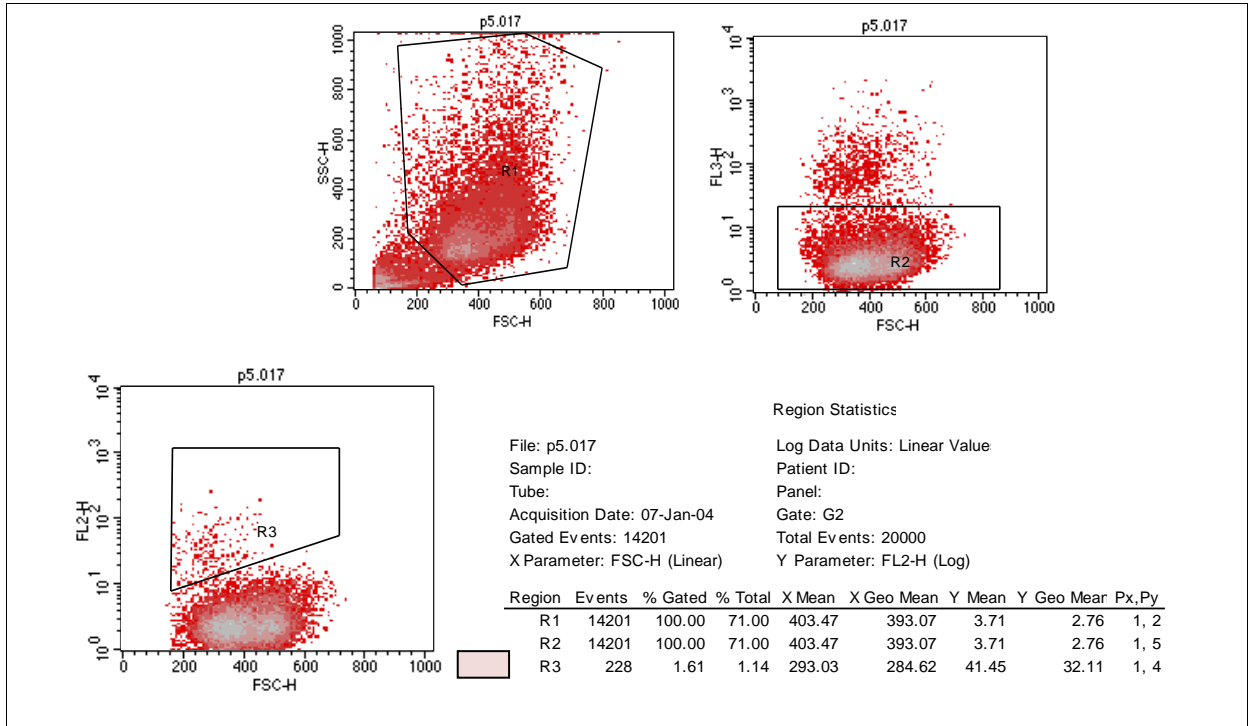


FIGURA 36 - ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P5.

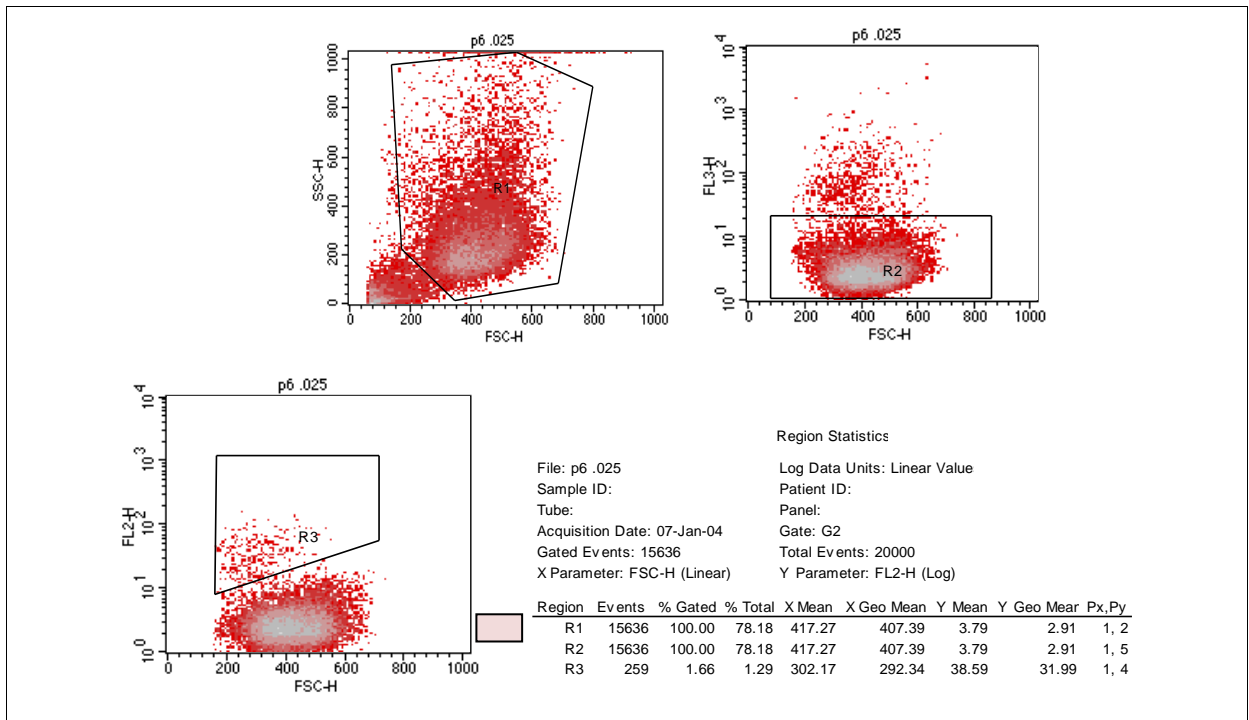


FIGURA 37 - ENSAIO DE ANEXINA V EM CÉLULAS B16F10 EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P6.

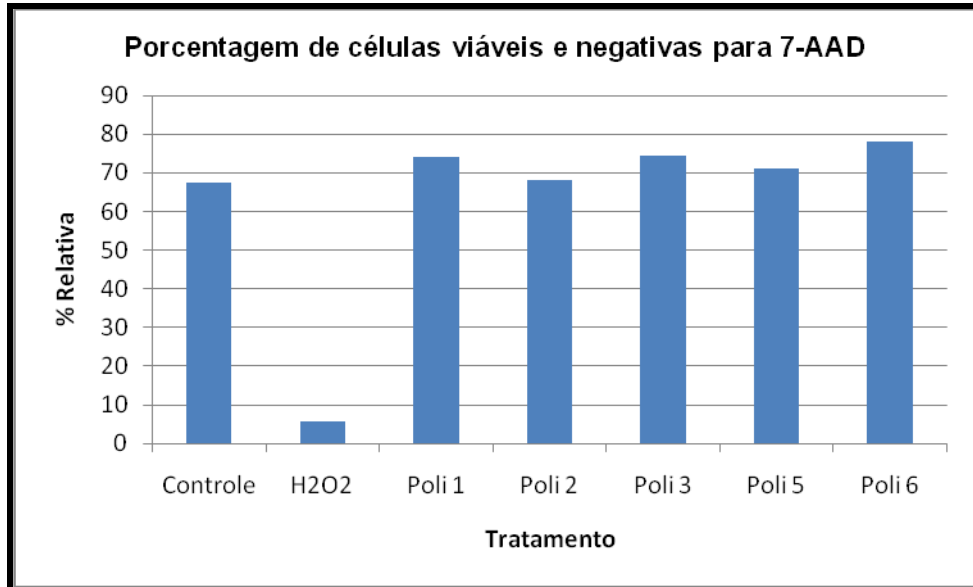


FIGURA 38 - GRÁFICO DO PERFIL DE MORTE CELULAR PELO MÉTODO 7 - AAD.

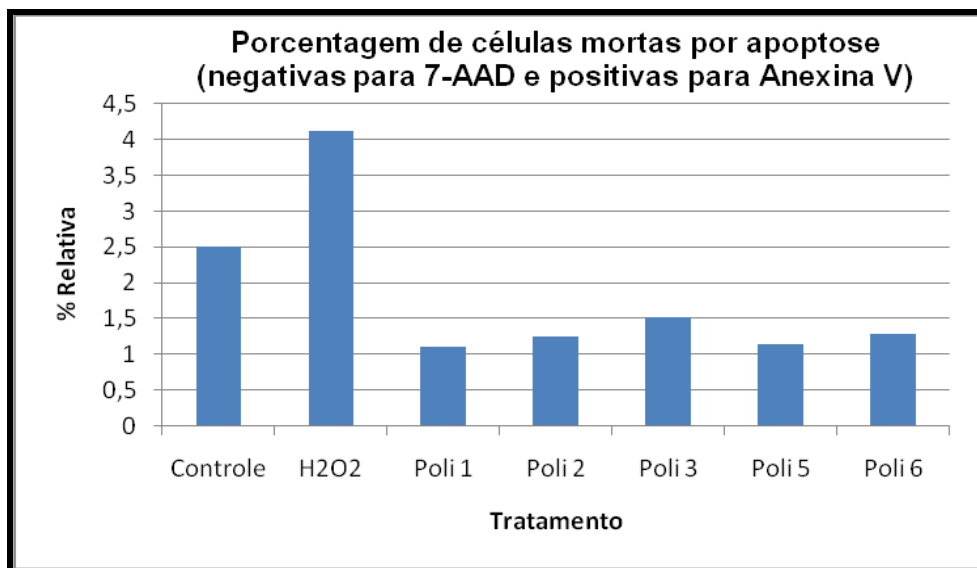


FIGURA 39 - GRÁFICO DO PERFIL DE MORTE CELULAR PELO MÉTODO ANEXINA-V.

7.3 ENSAIO PARA AVALIAR AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS (MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV) DA LINHAGEM B16F10, TRATADAS EM PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS DIFERENTES POLISSACARÍDEOS, NA CONCENTRAÇÃO DE 500 μ G/mL POR 24 HORAS DE TRATAMENTO.

Legenda:

- ➡ Células de tamanho regular
- ◀▶ Células sem inibição por contato, migrando umas sobre as outras
- ▶ Expansões celulares na forma de filopódios
- ⇒ Debris celulares
- Células redondas, característica de células mortas ou em processo de divisão celular.
- Células morfológicamente maiores em relação ao controle, com maior expansão do corpo celular e mais espreiadas

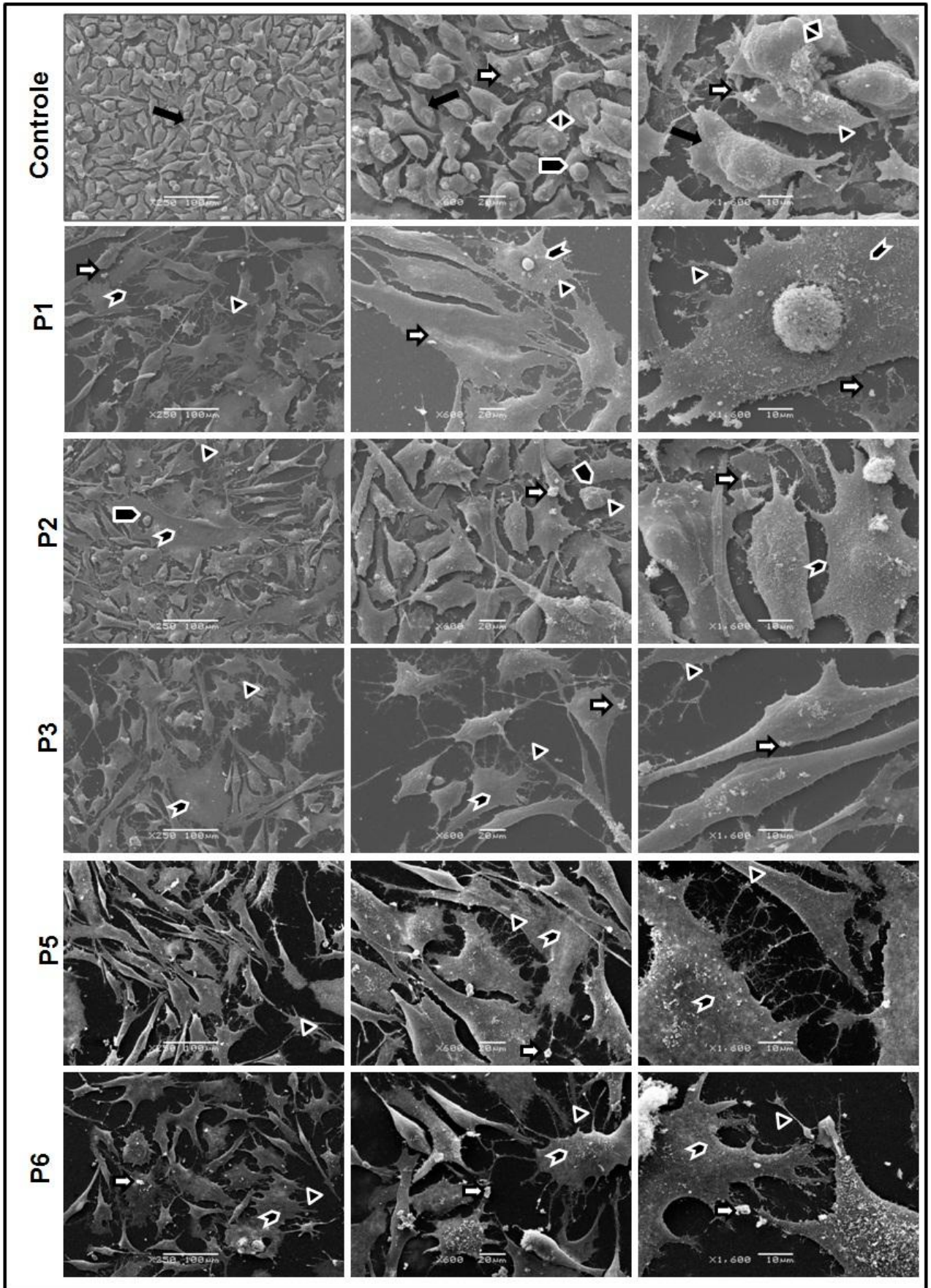


FIGURA 40 - ANÁLISE MORFOLÓGICA EM MEV DAS CÉLULAS B16-F10 DO GRUPO CONTROLE E EXPOSTAS AO POLISSACARÍDEO P1, P2, P3, P5 E P6, APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO NA CONCENTRAÇÃO DE 500 $\mu\text{G/mL}$.

As análises ultraestruturais em MEV demonstraram que a linhagem B16F10 controle, após 24h de manutenção em cultivo, estas células apresentaram tamanho regular (➡) são células que nesta imagem pode-se perceber que não apresentaram inibição de contato, estas migram umas sobre as outras, característica fácil de ser observada nas imagens (◀▶), morfologia característica de células tumorigênicas. Estas células controle apresentam expansões celulares na forma de filopódios reduzidos pouco expressivos (▶). Vê-se por sobre o cultivo depósitos de debris celulares, (⇨) bem como células redondas características de células mortas ou em processo de divisão celular (■).

Os resultados das imagens das células expostas aos diferentes polissacarídeos (P1, P2, P3, P5 e P6 respectivamente) mostram células com nítidas alterações no padrão morfológico após a exposição aos diferentes polissacarídeos. Estas células já nas imagens panorâmicas no aumento de 250 vezes, quando comparadas com as células controle, são células que não na totalidade, mas em grande número são células morfológicamente maiores (■), dando a impressão que em decorrência desta maior expansão do corpo celular parecem estar em menor número, estas estão adsorvidas, bem mais em contato íntimo com o substrato, mais espalhadas, assumindo um fenótipo de células mais aderidas e como consequência mais estacionárias, especialmente para os polissacarídeos P1, P5 e P6.

Muitas células assumem a morfologia bem estrelar, com inúmeras expansões celulares de forma arborescente ao redor de todo corpo celular, muito proeminentes, sendo esta característica a que mais as diferenciam quando comparadas com as células controles, especialmente proeminentes para as células expostas aos polissacarídeos P1, P3, P5 e de forma também evidente, mas menos numerosos para o polissacarídeo P6 (▶). Algumas células emitem longas e finas projeções membranares na forma de filopódios, especialmente o polissacarídeo P1 (▶). Pode-se visualizar debris celulares por sobre as células, em maior número para as células expostas aos polissacarídeos P6, P2, P5 e P3 respectivamente (⇨).

8 DISCUSSÃO

O tratamento para o câncer é baseado em protocolos de quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica. Embora a eficácia da quimioterapia na maioria dos tipos de câncer tenha melhorado nos últimos anos, ainda ocorrem diversos efeitos tóxicos contra tecidos saudáveis. Aproximadamente 30% dos pacientes com melanoma desenvolvem a doença metastática, e a sobrevida destes pacientes é abreviada quando as metástases são detectadas em múltiplos sítios viscerais. É clinicamente reconhecido que cânceres, de uma forma geral, quando em metástases avançadas, são geralmente insensíveis aos tratamentos convencionais, os quais além de pouco eficientes, geralmente, levam ao comprometimento da qualidade de vida dos pacientes (IBRAHIM & HALUSKA, 2009). A quimioterapia sistêmica é paliativa, sendo as drogas citotóxicas as mais utilizadas, com efeitos colaterais os mais diversos dependendo do tipo de droga empregada, do tempo de uso, do metabolismo e estado fisiológico do paciente, desta forma estes efeitos limitam muito a utilização de vários compostos, em doses mais concentradas, ou em cursos terapêuticos mais prolongados.

Portanto, o desenvolvimento de novas drogas continua sendo um desafio, dentre elas, as isoladas de produtos naturais os quais podem se tornar um possível fármaco com ação sobre específicas patologias e neste trabalho especial interesse para o câncer de pele (melanoma) com potencial de reduzir os efeitos colaterais (KESSLER *et al.*, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2006; SIENA, C., 2008). A busca por alívio e cura de doenças diversas pela ingestão de princípios ativos extraídos de produtos naturais com finalidade terapêutica talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização destes compostos, ela é amplamente empregada, pois estes compostos são encontrados distribuídos no ambiente e isso representa facilidade para sua aquisição (BARTON & OLLIS, 1986). Além disso, os medicamentos sintéticos podem ser mais agressivos ao organismo, proporcionando maiores efeitos colaterais conforme já mencionados, acrescido do alto custo aquisitivo. Assim diversos cientistas em diferentes linhas de investigações desenvolvem pesquisas multidisciplinares para que se faça possível uma utilização racional de produtos naturais com possível aplicação farmacológica os quais podem estar presentes e passíveis de serem extraídos da flora existente (MILLS & BONE, 2000; SIENA, C.,

2008). Mesmo assim, ainda é baixo o número de patentes registradas e de produtos resultantes de compostos naturais com aplicação medicinal, tendo em vista a imensa biodiversidade da flora de nosso país.

Recentemente, apesar de várias drogas clássicas derivadas de produtos naturais terem sido substituídas pelos fármacos de origem sintética, outras têm surgido e recebido atenção especial e prestígio científico e terapêutico. Um indício do renascimento de fármacos derivados de fontes vegetais é a grande quantidade e progresso da pesquisa clínica, especialmente no campo dos agentes anticancerígenos (antitumorigênicos), onde podem ser citados o taxol, a podofilotoxina e a camptotecina. Mas talvez a mais expressiva descoberta de fármacos de fonte natural seja a da vinca (*Catharanthus roseus*, Apocynaceae): a vincristina e a vinblastina. Estes são utilizados em todo o mundo, sendo a vincristina usada no tratamento de câncer de pele e em outras patologias não cancerosas, enquanto a vinblastina, nos casos de câncer de mama, testículo, pele e linfoma.

Em células de melanoma B16F10, o taxol e a camptotecina (ambas as substâncias extraídas de vegetais) inibiram a migração e a adesão celular (WANG *et al.*, 2003). Ainda nestas células, a vincristina, um dos já citados produtos naturais extraídos da vinca, pode mediar a expressão de um supressor de tumor, a proteína p53, a qual tem ação direta sobre a expressão de tubulinas, proteínas estas formadoras dos microtúbulos os quais sabidamente são recrutados para tornar competente a dinâmica de proliferação celular. Outro produto natural da vinca, a vinblastina, também já foi utilizado como um novo adjuvante na quimioterapia combinada contra o melanoma maligno de estágio III (ARAI *et al.*, 2006; SIENA, C., 2008).

Para o desenvolvimento deste trabalho houve um especial interesse em estudar compostos extraídos dos fungos, pois já há descrito na literatura que os do gênero *Pleurotus*, possuem capacidade de modular o sistema imunológico dentre inúmeras outras atividades como a ação antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana (ZHANG *et al.*, 1994; OOI e LIU, 2000; BAE *et al.*, 2005). Trabalhos envolvendo a ação antineoplásica dos polissacarídeos destes fungos têm sido reportados desde 1957 (OOI E LIU, 2000), como *Pleurotus ostreatus* (BOBEK *et al.*, 1998), *Pleurotus sajor-caju* (ZHUANG *et al.*, 1993) e *Pleurotus citrinopileatus* (ZHANG *et al.*, 1994). Também os fungos do gênero *Lentinus* são citados como imunomoduladores e com efeito antitumoral (ZHANG, *et al.*, 2007; CARBONERO *et*

al., 2008); e os do gênero *Agaricus* apresentam propriedades funcionais e medicinais, como modificadores da resposta biológica em linhagens tumorigênicas (SANTOS-NEVES *et al.*, 2008; KOMURA *et al.*, 2010).

Os mecanismos da atividade antitumoral destes polímeros ainda não estão claros, entretanto, parecem estar associados à ativação do sistema imunológico através da ativação dos macrófagos e do sistema complemento (LIU *et al.*, 1996).

Compostos bioativos isolados de algumas espécies de cogumelos medicinais apresentam atividades: antitumoral, imunomoduladora, antiproliferativa e hipotensiva (FORTES *et al.*, 2006).

Com o objetivo de investigarmos a possível ação citotóxica e ação sobre a viabilidade celular após exposição ao diferentes polissacarídeos na concentração de 500µg/mL, empregamos as seguintes metodologias: MTT (FIGURA 30 - 24horas, 31- 48horas). Os nossos resultados evidenciam que os polissacarídeos P1, P2, P4 e P6 nos tempos de 24 horas, 48 horas não apresentaram citotoxicidade celular (FIGURAS 30 e 31). Em contrapartida os demais polissacarídeos P3, P5, apresentaram citotóxicos no tempo de 24 horas (FIGURA 30). No tempo de 48 horas somente o polissacarídeos P3 apresentou citotoxicidade, demonstrando que com o decorrer do período as células lançam mão de estratégias celulares adaptativas para recuperarem a homeostase celular. Resultados obtidos de *Nuphar pumilum*, por exemplo, mostraram efeito citotóxico em linhagens de leucemia humana (U937), melanoma murino (B16F10) e fibroblasto humano (HT1080), através da indução de apoptose nas células, possivelmente ativando as caspases-8 e -3 (MATSUDA *et al.*, 2006). A literatura relata que, três frações de *Pleurotus ostreatus*, formados de proteoglicanos, foram administradas intraperitonealmente em camundongos, na dose de 5mg/Kg por 6 dias, para observar sua ação sobre o Sarcoma 180 no modelo ascítico. Foi constatada a atividade antitumoral com redução de até 90% no número de células tumorais (ação citotóxica do composto frente ao modelo experimental), elevação das células NK e produção de óxido nítrico (SARANGI *et al.*, 2006). Os trabalhos realizados por WOLFF (2007), avaliando a eficácia de diferentes substâncias obtidas de *Pleurotus ostreatus*, cultivado tanto em meio sólido como em meio líquido sobre Sarcoma 180, revelaram que a maior taxa média de redução (86%) foi identificada quando camundongos foram tratados com caldo de cultivo *in natura*. Resultados da literatura mostraram que o extrato hidroalcoólico fluido de casca de *R. sellowii* inibiu significativamente a proliferação das células de melanoma

murino B16F10 sem afetar sua viabilidade exercendo, portanto, um efeito citostático, mas não citotóxico (SIENNA *et al.*, 2006). Os resultados deste trabalho sobre o mecanismo de morte celular induzido pelos diferentes polissacarídeos (apoptose ou necrose), empregando-se análise em citômetro de fluxo com o ensaio de Anexina V /7-AAD. Nesta metodologia não foi possível observar morte celular em níveis significativos em 20.000 eventos analisados, o que significa que estatisticamente estes valores representam não indução de morte pelos mecanismos analisados. Tais resultados de citotoxicidade e mecanismo de morte celular estão parcialmente apoiados pelos dados encontrados na literatura. Desta forma há necessidade de realizar demais experimentos que possam nos dar parâmetros certos que nos proporcionem maior segurança frente aos nossos resultados encontrados.

Com o objetivo de se verificar o possível papel dos diferentes polissacarídeos frente a maior interação destas células tratadas com a matriz extracelular, aumento do grau de espraiamento celular, com concomitante alteração da morfologia destas células, empregou análise morfológica e ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Visto que células mais aderidas e espraiadas tendem a assumir um fenótipo de células estacionárias, ou seja menos migratórias com diminuição da capacidade metastática.

A literatura compulsada relata que a perda de expressão de moléculas de adesão celular induz mudança na morfologia das células, e assim na arquitetura tecidual; bem como alterações nas interações entre as células, modificando a arquitetura tecidual, podendo desencadear o desprendimento das células do substrato quando em análise *in vitro* ou do tumor primário quando que em estudo *in vivo*, permitindo com estas alterações a invasão do tecido conectivo, degradando os constituintes da matriz extracelular em especial os componentes da membrana basal, aumentando o poder invasivo das células tumorais. Gera-se assim um tumor secundário, pois as células aderem no tecido endotelial vascular, atravessam a membrana basal, colonizando um novo órgão. (FIDLER, 2003; PASCO *et al.*, 2004, OUHTIT *et al.*, 2009). Com o intuito de modular negativamente esta capacidade metastática, os resultados encontrados após exposição aos diferentes polissacarídeos evidenciaram que, a linhagem B16F10 controle, apresentou tamanho regular, são células que nesta imagem pode-se perceber que não apresentaram inibição de contato, estas migram umas sobre as outras, morfologia característica de células tumorigênicas. As imagens da Microscopia Eletrônica de

Varredura - MEV (FIGURA 40) evidenciam que as células expostas aos polissacarídeos (P1, P2, P3, P5 e P6) apresentam células com nítidas alterações no padrão morfológico, são células que não na totalidade, mas em grande número são células morfolologicamente maiores, dando a impressão que em decorrência desta maior expansão do corpo celular parecem estar em menor número, estas estão adsorvidas, bem mais em contato íntimo com o substrato, mais espreiadas, assumindo um fenótipo de células mais aderidas e como consequência mais estacionárias, especialmente para os polissacarídeos P1, P5 e P6. Os resultados apresentados mostram que muitas células assumem a morfologia bem estrelar, com inúmeras expansões celulares de forma arborescente ao redor de todo corpo celular, muito proeminentes, sendo esta característica a que mais as diferenciam quando comparadas com as células controles, especialmente proeminentes para as células expostas aos polissacarídeos P1, P3, P5 e de forma também evidente, mas menos numerosos para o polissacarídeo P6. Estas alterações no padrão morfológico destas células estão intimamente relacionadas com alterações de biomoléculas específicas que constituem as membranas destas células, as moléculas de matriz extracelular bem como dos constituintes do citoesqueleto.

A bibliografia relata que as proteínas de matriz extracelular têm sido relacionadas na modulação de proliferação, migração, adesão e espreiamento celular. Evidências diretas têm demonstrado que proteoglicanos de heparam sulfato de superfície celular (sindecam-2), participam na formação das fibras de estresse e juntamente com as integrinas ($\alpha_5\beta_1$) atuam na adesão celular e espreiamento celular sobre uma superfície de fibronectina (KUSANO et al., 2000). ITANO et al. (1996), em estudos realizados em células de carcinoma derivadas do pulmão, demonstraram que os proteoglicanos de heparam sulfato interagem com a fibronectina através de suas cadeias de HS, modulando esta adesividade. A literatura ainda relata que o sindecam-4 (proteoglicano de membrana celular) participa com as integrinas para a formação dos contatos de adesão focais, interagindo com proteínas de matriz, proteínas de membrana e com os constituintes do citoesqueleto, sendo importantes nos processos relacionados à adesão, espreiamento e à migração celular (WOODS e COUCHMAN, 1994, 2000; TUMOVA et al., 2000).

Células leucêmicas que expressam sindecam-1 não invadem matriz de colágeno Tipo I. Por outro lado, células deficientes na expressão de sindecam-1 são positivas, e quando transfectadas com o cDNA de sindecam-1 passam a exibir uma

redução dramática na capacidade de invasão comparada com as células parentais, apresentando-se mais aderidas e espraiadas (LIEBERSBACH e SANDERSON, 1994).

Alguns trabalhos mostram a redução significativa do tumor sólido “*in vivo*” de modelos murinos, tratados com polissacarídeos em injeções diárias intraperitoneais de 100mg/kg de animal. E também sugerem que o mecanismo de ação antitumoral dos polissacarídeos envolve a promoção de apoptose celular (BAE *et al.*, 2005). Outros trabalhos mostram redução significativa, com ensaios *in vitro* empregando células da linhagem murina B16F10, e foi possível avaliar ação sobre a adesão celular, em 75% e 80%; da invasão celular em 89% e 99%; e da metástase em até 80%, com o uso de terapias utilizando polissacarídeos extraídos de fungos, demonstrando reduções dose dependentes (HAN, 2006a; HAN, 2006b).

Frente aos resultados encontrados e diante das informações contidas na literatura temos como objetivo na sequência deste trabalho, rastreamos estes alvos biológicos mencionados anteriormente para se ter uma resposta de quais destes poderiam estar sendo modulados e ou estão tendo alteração no padrão de biossíntese que nos proporcionem maior entendimento das rotas biológicas realizadas por estas células expostas a estes diferentes polissacarídeos.

9 CONCLUSÕES

Concluimos com este trabalho que:

Para o ensaio de MTT:

- Os polissacarídeos P1, P2, P4 e P6 nos tempos de 24 horas, 48 horas não apresentaram citotoxicidade celular (FIGURAS 30 e 31);
- Os demais polissacarídeos P3, P5 apresentaram citotóxicos no tempo de 24h e o polissacarídeo P3 no tempo de 48 horas (FIGURAS 31 e 31);

Avaliação da apoptose por Anexina V /7-AAD:

• Não foi possível observar morte celular, em níveis significativos, em 20.000 eventos analisados. Foi detectado um percentual médio de morte celular mais expressivo para as células controle do que as expostas aos diferentes polissacarídeos, o que significa que estatisticamente, estes valores não representam indução de morte pelos mecanismos analisados. Devemos refazer estes experimentos para se ter certeza dos resultados aqui alcançados.

Análise morfológica em microscopia eletrônica de varredura (MEV):

• Células controle são menores e não apresentam inibição de contato, características de células tumorigênicas; células expostas aos polissacarídeos P1, P5 e P6 apresentam-se maiores, mais espalhadas, mais aderidas e conseqüentemente mais estacionárias; células expostas aos polissacarídeos P1, P3 e P5 apresentaram morfologia estrelar e expansões celulares de forma arborescente ao redor de todo corpo celular muito proeminentes.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J.C.; WATT, F.M. Regulation of development and differentiation by the extracellular-matrix. **Development**, 1993, v.117, n.4, p.1183-1198.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (2006). **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. São Paulo: Artmed.

ARAI, K.; MATSUMOTO, Y.; NAGASHIMA, Y.; YAGASAKI, K. (2006). Regulation of class II beta-tubulin expression by tumor suppressor p53 protein in mouse melanoma cells in response to Vinca alkaloid. **Mol. Cancer Res.**, v. 4, p. 247-255.

BAE, J.; JANG, K.; YIM, H.; JIN, H.(2005). Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. **Cancer Letters**. 218, 43-52.

BARTON, D. OLLIS, W.D. (1986). *Advances in Medicinal Phytochemistry*. John Libbey, London, pp. 195.

BERNFIELD, M.; KOKENYESI, R.; KATO, M.; HINKES, M.T.; SPRING, J.; GALLO, R.L.; LOSE, E.J. Biology of the syndecans. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, 1992, v.8, p.365-393.

BERNFIELD, M.; GÖTTE, M.; PARK, P.W.; REIZES, O.; FITZGERALD, M.L.; LINCECUM, J.; ZAKO, M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Annu. Rev. Biochem.**, 1999, v.68, p.729-777.

BEROVIC, M.; HABIJANIC, J.; ZORE, I.; WRABER, B.; HODZAR, D.; BOH, B.; POHLEVEN, F. (2003). Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**, 103, 77-86.

BLOOM, L.; INGHAM, K.C.; HYNES, R.O. Fibronectin regulates assembly of actin filaments and focal contacts in cultured cells via the heparin-binding site in repeat III13. **Molecular Biology of the Cell**, 1999, v.10, n.5, p.1521-1536.

BOBEK, P.; GINTER E; KUNIAK L; BABALA J; JURCOVICOVA M; OZDÍN L; CERVEN J. (1991). Effect of mushroom *Pleurotus ostreatus* and isolated fungal polysaccharide on serum and liver lipids in syrian hamsters with hyperlipoproteinemia. **Nutrition**, v. 7, n. 2.

BORCHERS A.T.; STERN J.S.; HACKMAN R.M.; KEEN C.L.; GERSHWIN M. E. (1999). Mushrooms, tumors and immunity. **Proc Soc Exp Biol Med.** 221:281-293.

BOURDREAU, N.J.; JONES, P.L. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. **Biochem. J.**, 1999, v.339, p.481-488.

BURNS, P. J.; YEO, P.; KESHAVARZ, T.; ROLLER, S.; EVANS, C. S. (1994). Physiological studies of exopolysaccharide production from basidiomycetes *Pleurotus* sp.; effect of C and N source on polysaccharide production for potential as a hypocholesterolemic, antitumor and a fat mimetic. **Enzyme Microbiology Technology**, 34: 566-572.

CARBONERO ER, A.H.P. GRACHER, D.L. KOMURA, R. MARCON, C.S. FREITAS, C.H. BAGGIO, A.R.S. SANTOS, G. TORRI, P.A.J. GORIN, M. IACOMINI. (2008). *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, Volume 111, Issue 3, 1 December 2008, Pages 531-537.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.P.; ROSA, M.C.C.; TORRI, G.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. (2008). Unusual partially 3-O-methylated galactan from mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Phytochemistry**, 69, 252–257.

CALDERWOOD, D.A.; SHATTIL, S.J.; GINSBERG, M.H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. **Journal of Biological Chemistry**, 2000, v.30 – 275, p.22607-22610.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. (2007) Medicinal importance of fungal β -(1/3), (1/6)-glucans. **Mycological Reserach**, 111 6: 635-652.

DIETRICH, C.P.; MCDUFFIE, N.M.; SAMPAIO, L.O. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose-gel electrophoresis. **Journal of Chromatography**, 1977, v.130, p. 299-304.

DIETRICH, C.P.; SAMPAIO, L.O.; TOLEDO, O.M.S.; CASSARO, C.M.F. Cell recognition and adhesiveness - possible biological role for sulfated mucopolysaccharides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1977, v.75, n.2, p.329-336.

DIETRICH, C.P.; SAMPAIO, L.O.; MONTES DE OCA, H.; NADER H.B. Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation. **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, 1980, v.52, p.179-186.

DIETRICH, C.P. A model of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 1984, v.17, p.5-15.

DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; TOMA, L.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. A relationship between the inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate synthesis and the inhibition of molting by selenate in the hemiptera *Rhodnius prolixus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1987, v.146, p.652-658.

DOWD, C.J.; COONEY, C.L.; NUGENT, M.A. Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. **Journal of Biological Chemistry**, 1999, v.274, n.8, p.5236-5244.

EVERED, D.; WHELAN, J. **The biology of hyaluronan**. John Wiley & Sons., 1989.

FIDLER, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature**, v. 3.

FILMUS, J.; SHI, W.; WONG, Z.M.; WONG, M.J. Identification of a new membrane-bound heparan sulphate proteoglycan. **Biochem. J.**, 1995, v.311, p.561-565.

FORTES, R. C.; TAVEIRA, V. C.; NOVAES, M. R. C. G. (2006). The immunomodulator role of β -D-Glucans as co-adjuvant for cancer therapy. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, 21(2): 163-168.

FRANCO C.R.; ROCHA, H.A.; TRINDADE, E.S.; SANTOS, I.A.; LEITE, E.L.; VEIGA, S.S.; NADER, H.B.; DIETRICH, C. P. (2001). Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase. **Braz J Med Biol Res**. 34(8):971-5.

GAMBARINI, A.G.; Miyamoto C.A.; Lima G.A.; Nader H.B.; Dietrich C.P. Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. **Mol. Cell Biochem.**, 1993, v.124, p.121-129.

GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. **Cell**, 1990, v.60, p.849-859.

GOSPODAROWICZ, D.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; NEUFELD, G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth-factor. **Endocrine Reviews**, 1987, v.8, n.2, p.95-114.

GRIMSTAD, I.A. Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. **Exp. Cell Res.**, 1987, v.173, p.515-523.

GUIMARÃES, FSF; ANDRADE, LF; MARTINS, S.T.; ABUD, APR; SENE, RV; WANDERER, C; TISCORNIA, I.; BOLLATI-FOGOLÍN, M.; BUCHI, DF.; TRINDADE, ES. *In vitro* and *in vivo* anticancer properties of a *Calcarea carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. 2010. **BMC Cancer**, 10:113

GUIMOND, S.E.; TURNBULL, J.E. Fibroblast growth factor receptor signalling is dictated by specific heparan sulphate saccharides. **Curr. Biol.**, 1999, v.9, p.1343-1346.

HAY, E.D. Extracellular matrix. **J. Cell Biol.**, 1981, v.91, p.205-223.

HUANG, Q., JIN, Y., ZHANG, L., CHEUNG, P. C. K., KENNEDY, J. F. (2007) Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia produced in fermenter. **Carbohydrate Polymers**, 70:324–333.

IBRAHIM, N.; HALUSKA, F.G. (2009). Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms nageatte. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, v. 4, p. 551 – 579.

INCA, Incidência e Mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_43/v03/editorial.html>. Acesso em: 02 jul 2007.

INCA, Incidência e Mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 11 maio 2010.

INCA, Câncer. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 14 fev 2011.

INCA, Câncer de Pele, Melanoma. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335. Acesso em: 14 fev 2011.

ITANO, T.; MATSUI, H.; DOI, A.; OHMURA, Y.; HATASE, O. Identification of calmodulin-binding proteins in pure mitochondria by photoaffinity-labeling. **Biochemistry International**, 1986, v.13, n.5, p.787-792.

JEANLOZ, R.W. The nomenclature of mucopolysaccharides. **Arthritis Rheum.** 1960, v.3, p.233-237.

JEMAL, A.; BRAY, F.; MELISSA, M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA CANCER J CLIN**, v.61, p.61:69–90, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (2004) **Histologia Básica**. 10^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

KESSLER, J.H.; MULLAUER, F.B.; ROO, G.M. de; MEDEMA, J.P. (2006). Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. **Cancer Lett.**, p.1-14.

KOMURA, D.L.; CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.; SANTOS, A.R.; GORIN, P.A.; IACOMINI, M. (2010). Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresour Technol.** 2010 Aug;101(15):6192-9.

KRAEMER, P.M.; TOBY, R.A. Cell cycle dependent desquamation of heparan sulfate from the cell surface. **J. Cell Biol.**, 1972, v.55, p.713-717.

KUSANO, Y.; OGURI, K.; NAGAYASU, Y.; MUNESUE, S.; ISHIHARA, M.; SAIKI, I.; YONEKURA, H.; YAMAMOTO, H.; OKAYAMA, M. Participation of syndecan 2 in the induction of stress fiber formation in cooperation with integrin $\alpha 5\beta 1$: structural characteristics of heparan sulfate chains with avidity to COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. **Exp. Cell Res.**, 2000, v.256, p.434-444.

KWAN, CHI-PONG.; VENKATARAMAN, G.; SHRIVER, Z.; RAMAN, R.; LIU, D.; QI, Y.; VARTICOVSKI, L.; SASISEKHARAN, R. Probing fibroblast growth factor dimerization and role of heparin-like Glycosaminoglycans in modulating dimerization and signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001, v.278, n.28, p.23421-23429.

LIEBERSBACH, B.F.; SANDERSON, R.D. Expression of syndecan-1 inhibits cell invasion into type I collagen. **J. Biol. Chem.**, 1994, v.269, p. 20013-20019.

LIU, F.; SELLS, M.A.; CHERNOFF, J. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. **Current Biology**, 1998, v.8, n.3, p.173-176.

LIU, W.; LITWACK, E.D.; STANLEY, M.J.; LANGFORD, J.K.; LANDER, A.D.; SANDERSON, R.D. Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and antiinvasive molecules: syndecans and glypican have distinct functions. **J. Biol. Chem.**, 1998, v.273, p.22825-22832.

LIU, F; OOI, E.C.; LIU, W.K.; CHANG, T. (1996). Immunomodulation and antitumor activity of polisaccharide-protein complex from the culture filtrates of a local edible mushroom, *Tricholoma lobayense*. **Gen. Pharmac.**, 27(4), 621-624.

MALI, M.; ANDTFOLK, H.; MIETTINEN, H.M.; JALKANEN, M. Suppression of tumor-cell growth by syndecan-1 ectodomain. **Journal of Biological Chemistry**, 1994, v.269, n.45, p.27795-27798.

MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.F.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R. (2007). B-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, article in press.

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, 1975, v.19, p.99, 104, 135, 175, 213.

MEYER, K. The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, 1938, v.6, p.91-102.

MILLS, S. & BONE, K.(2000). Principles and practice of phytotherapy. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 643.

MIZUNO M. (2000). Anti-tumor polisaccharides from mushrooms during storage. **BioFactors**. 12: 275-281.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, EUA

<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/Patient>. disponível em 29/07/11.

NUGENT, M.A.; IOZO, R.V. Fibroblast growth factor-2. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2000, v.32, n.2, p.115-120.

OOI, V. E. C.; LIU, F. (2000). Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. **Current Medicinal Chemistry**. 7:715-729.

OUHTIT,A.; GAUR, R.L.; ELMAGEED, Z.Y.A.; FERNANDO, A.; THOUTA, R.; TRAPPEV, A.K.; ABDRAHMAN, M.E.; SAYYAD, H.I.E.; RAO, P.; RAJ, M.G.H. Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1795, p. 130 – 136, 2009.

PALACIOS, L.G.; ALLEGRA, M.; SPIRITO, F.; POMMERET, C.R.; ORTONNE, J.P.; MENEGUZZI, G. The short arm of the laminin γ 2 chain plays a pivotal role in the incorporation of laminin 5 into the extracellular matrix and in cell adhesion. **J. Cell Biol.**, 2001, v.153, n.4, p.835-849.

PASCO, S.; RAMONT, L.; MAQUART, F.X.; MONBOISE, J.C. (2004). Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 49, 221 - 233.

PENC, S.F.; POMAHAC. B.; WINKER, T.; DORSCHNER, R.A.; ERIKSSON, E.; HERNDON, M.; GALLO, R.L. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. **Journal of Biological Chemistry**, 1998, v.273, n.43, p.28116-28121.

PORCIONATTO, M.A.; MOREIRA, C.R.; LOFTI, C.F.P.; ARMELIN, H.A.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Stimulation of heparan sulfate proteoglycan synthesis and secretion during G₁ phase induced by growth factors and PMA. **Journal of Cellular Biochemistry**, 1998, v.70, p.563-572.

PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Heparan sulfate and cell division. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1999, v.32, p.539-544.

PRAMANIK, M.; SOUMITRA, M.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. (2004). Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. Department of Chemistry and Chemical Technology, **Vidyasagar University**, West Bengal, India.

PYE, D.A.; VIVES, R.R.; TURNBULL, J.E.; HYDE, P.; GALLAGHER, J.Y. Heparan sulfate oligosaccharides requires 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. **Journal of Biological Chemistry**, 1998, v.273, n.36, p.22936-22942.

RAPRAEGER, A.C.; OTT, V.L., Molecular interactions of syndecan core proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 1998, 10: 620-628.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p. 803-810, 1998.

SANTOS-NEVES, J.C.; PEREIRA, M.I.; CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.; GORIN, P.A.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M. (2008). A gel-forming beta-glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydr Res.** 2008 Jul 7;343(9):1456-62.

SAONCELLA, S.; ECHTERMEYER, F.; DENHEZ, F.; NOWLEN, J.K.; MOSHER, D.F.; ROBINSON, S.D.; HYNES, R.O.; GOETINCK, P.F. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1999, v.96, p.2805-2810.

SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S.K.; MALLICK, S.K.; MAITI, T.K. (2006). Antitumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, 6, 1287-1297.

SIENNA, C. (2008). Efeitos do extrato de casca de *Rauwolfia sellowii* Mull. Arg. e de suas frações sobre a proliferação, viabilidade e o conteúdo de melanina de células de melanoma murino B16F10. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. **Universidade Federal do Paraná**.

SMIDERLE, F.R. et al. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, 2008.)

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

TERRANOVA, V.P.; LIOTTA, L.A.; RUSSO, R.G.; MARTIN, G.R. Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells. **Cancer Res.**, 1982, v.42, p.2265-2269.

TERRANOVA, V.P.; WILLIAMS, J.E.; LIOTTA, L.A.; MARTIN, G.R. Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin. **Science**, 1984, v.226, p.982-985.

THANGAPAZHAM R. L.; SHARMA, A.; MAHESHWARI, R. K. (2006). Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. **The AAPS journal**. 8(3) E443-9.

TUCCI, M.G.; LUCARINI, G.; BRANCORSINI, D.; ZIZZI, A.; PUGNALONI, A.; GIACCHETTI, A.; RICOTTI, G.; BIAGINI, G. Involvement of E-cadherin, b-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. **Dermatopathology**, v. 157, p. 1212–1216, 2007.

TUMOVA, S.; WOODS, A.; COUCHMAN, J.R. Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 2000, v.32, p.269-288.

TURNBULL, J.; POWELL, A.; GUIMOND, S. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. **Trends in Cell Biology**, 2001, v.11, n.2, p.75-82.

UNDERWOOD, P.A.; BEAN, P.A.; WHITELOCK, J.M. Inhibition of endothelial cell adhesion and proliferation by extracellular matrix from vascular smooth muscle cells: role of type V collagen. **Atherosclerosis**, 1998, v.141, p.141-152.

VISVADER, J.E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, p. 314 – 322, 2011.

WANG, F.; CAO, Y.; LIU, H. Y.; XU, S. F.; HAN. (2003). R. Anti-invasion and anti angiogenesis effect of taxol and camptothecin on melanoma cells. **J. Asian Nat. Prod. Res**, v. 5, p.121-129.

WHITTARD, J.D.; AKIYAMA, S.K. Activation of β_1 integrins induces cell-cell adhesion. **Exper. Cell Res.**, 2001, v.263, p.65-76.

WOLFF, E.R.S. Estudo in vivo da atividade antitumoral de substâncias bioativas sintetizadas por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. (2007). Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente, **Universidade da Região de Joinville**, Joinville.

WOODS A.; COUCHMAN J.R. Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. **J. Cell Sci.**, 1992, v.101, p.227-290.

WOODS, A.; COUCHMAN, J.R. Syndecan-4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. **Mol. Biol. Cell**, 1994, v.5, p.183-192.

WOODS, A.; COUCHMAN, J.R. Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. **Trends in Cell Biol.**, 1998, v.8, p.189-192.

WOODS, A.; COUCHMAN J.R. Integrin modulation by lateral association. **J. Biol. Chem.**, 2000, v.275, p.24233-24236.

YOSHIOKA, Y.; TABETA, R.; SAITO, H.; UEHARA, N.; FUKUOKA, F. (1985). Antitumor polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) QUÉL: isolation and structure of a β -glucan. **Carbohydrate Research**, 140: 93-100.

ZHANG M, S.W.; CUI, P.C.K.; CHEUNG, Q.; WANG (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, 18:4-19.

ZHANG, J.; WANG, G.; LI, H.; ZHUANG,C.; MIZUNO, T.; ITO,H.; SUZUKI,C.; OKAMOTO, H.; LI, J. (1994). Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, Yuhuangmo, the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. **Bios. Biotech. Biochem.**, 58(7), 1195-1201.

ZHUANG,C.; MIZUNO, T.;SHIMADA,A.; ITO, H.; SUZUKI, C.; MAYUZUMI, Y.; OKAMOTO, H.; MA, Y; LI, J. (1993). Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese Mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor caju* (Fr.) Sing. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 57 (6), 901 – 906.