

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VICTOR HUGO CAMILLO FERREIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS  
SOBRE MODELO DE MELANOMA MURINO "IN VITRO".



CURITIBA

2012

VICTOR HUGO CAMILLO FERREIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS  
SOBRE MODELO DE MELANOMA MURINO “IN VITRO”.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Co-orientadora: Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira

CURITIBA

2012

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

Ferreira, Victor Hugo Camillo

Avaliação da atividade biológica de polissacarídeos sulfatados sobre modelo de melanoma murino "*in vitro*". / Victor Hugo Camillo Ferreira. – Curitiba, 2012.

53 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade

Co-orientadora: Carolina Camargo de Oliveira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

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

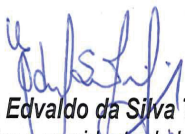
CDD (20. ed.) 616.994

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

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

## PARECER

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



**Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade**  
Orientador e presidente da banca  
Departamento de Biologia Celular - UFPR



**Profa. Dra. Sheila Maria B Winnischofer**  
Departamento de Bioquímica - UFPR



**Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade**  
Departamento de Fisiologia - UFPR


E tendo como suplente,

**Profa. Dra. Olga Meiri Chaim**  
Departamento de Biologia Celular - UFPR

Após arguir o *mestrando* **Victor Hugo Camillo Ferreira**, em relação ao seu trabalho intitulado: "**Avaliação da atividade biológica de polissacarídeos sulfatados sobre modelo de melanoma murino "in vitro"**", são de parecer favorável à..... do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

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

Curitiba, 31 de Agosto de 2012



**Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Matr. 185795

**Dedico este trabalho à minha mãe, Marilene Camillo, e a minha noiva, Andressa Franzói, pelo carinho e amor.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer as duas pessoas que nunca duvidaram das minhas capacidades e sempre acreditaram e apoiaram este sonho que está sendo realizado, minha mãe Marilene Camillo e minha noiva, Andressa Franzói. Gostaria também de agradecer a todo o resto de minha família, que estiveram ao meu lado nessa caminhada, meus tios Marilú e Evaldo, minhas avós Geny e Ormindá, meus primos Thiago e Mariana.

É impossível esquecer a oportunidade que foi dada pelo meu orientador, Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade, que acabou virando muito mais do que um orientador para mim, e sim um amigo e conselheiro, muito obrigado por tudo que você proporcionou a minha vida, as mudanças foram muito e sempre para melhor.

Francine, Stellee, Beatriz, Gustavo, Diogo, Simone, Katia, Daniel, Diego, Lucas muito obrigado pelos inúmeros momentos de risadas, conversas descontraídas, podem ter certeza que elas foram essenciais para melhor fluidez do trabalho em conjunto.

Prof. Dra. Carolina Camargo de Oliveira, muito obrigado pela co-orientação e por todas as palavras colocadas nos momentos corretos, as vezes gerando pânico, mas na maioria das vezes trazendo calma e confiança a todos.

Prof. Dra. Dorly Buchi, muito obrigado por todo o conhecimento que você nos passou, não somente os científicos, mas sim os conhecimentos de vida, que muitas vezes tornam-se tão essenciais, obrigado por me ouvir e me aconselhar.

Fran, tinha que ter um espaço especial a você aqui, por me aturar tanto tempo em tantos experimentos que fizemos em conjunto, e olha que isso não deve ser fácil, então muito obrigado.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Hugo Rocha, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, por gentilmente ceder os polissacarídeos sulfatados com os quais eu trabalhei todo esse período.

Finalmente, gostaria de agradecer a Deus. Muito obrigado por tudo.

**Imagine uma nova história para sua vida e acredite nela.**

**Paulo Coelho**

## RESUMO

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele sendo considerado um problema de saúde pública mundial, destacando-se por sua alta capacidade metastática. Esse tipo de câncer não é responsivo aos tratamentos convencionais, o que piora o prognóstico do paciente. Aliado a isto, destaca-se o tratamento de uma complicação secundária desenvolvida por pacientes com câncer, a síndrome de Trousseau, que tem como tratamento a administração de heparina que, em muitos casos, leva a um aumento na sobrevivência do paciente. A heparina é um polissacarídeo sulfatado de origem animal susceptível a possíveis contaminações com proteínas e com efeitos colaterais importantes. Por outro lado, as fucanas são polissacarídeos sulfatados, também com atividade anticoagulantes, mas obtidas de algas marinhas, o que evita a contaminação com proteínas animais. Dados da literatura relatam possíveis atividades antitumorais provenientes desses compostos. Devido ao exposto, esse estudo teve como objetivo a prospecção de três polissacarídeos sulfatados (Heparina, Fucana A e Fucana C) em modelo de melanoma murino "in vitro". Para isso, foram utilizadas células B16-F10 como modelo, e avaliado o perfil de citotoxicidade e viabilidade celular quando expostos aos tratamentos, bem como o perfil do ciclo celular, análise das alterações morfológicas e capacidade migratória. Os tratamentos com os diferentes polissacarídeos sulfatados não causaram citotoxicidade e nem genotoxicidade. Não houve diminuição significativa na viabilidade celular, e nem danos aparentes no DNA, quando comparado com grupo controle. Porém, quando foi analisada a morfologia celular, as células tratadas com Fucana C apresentaram um maior espalhamento e adesão celular, quando observadas por microscopia eletrônica de varredura, comparada com os demais grupos. A análise ultraestrutural, realizada por microscopia eletrônica de transmissão, demonstrou que as células que receberam heparina como tratamento, tiveram um "swellamento" acentuado em suas mitocôndrias, fato esse que geralmente precede eventos de apoptose. Após novos testes realizados para avaliar apoptose causada pelos tratamentos, observou-se que todos os grupos estariam sofrendo um índice de aproximadamente 10% de morte celular. Além disso, observou-se que a Heparina e a Fucana C apresentaram um maior número de células na fase G2/M, provavelmente pela tentativa de manutenção da homeostase, pois ao entrar em apoptose ocorrem estímulos para as células vizinhas aumentarem a proliferação. Na maior dose testada, os diferentes polissacarídeos apresentaram indícios de morte celular, utilizando ensaio de MTT observou-se que apoptose poderia acontecer em doses/tempos maiores do que os utilizados no presente trabalho. Sendo assim, estudos futuros são necessários para determinar se em baixas concentrações, os polissacarídeos apresentam atividade biológica contra células tumorais de melanoma.

Palavras chave: Melanoma, polissacarídeos sulfatados, heparina, fucana.



## ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer being considered a public health problem worldwide, especially for its highly metastatic ability. Usually, it is not responsive to conventional treatments, which worsens the prognosis. Treatment of a secondary syndrome developed by cancer patients, trousseau syndrome, which is handling the administration of heparin, showed an increase in patient survival. Heparin is a sulfated polysaccharide obtained from animal and susceptible to contamination that can lead to serious collateral effects. Moreover, fucans are sulfated polysaccharides derived from seaweed, that also have anticoagulant effects, which can potentially reduce the contamination incidence. Literature data indicates potential antitumor activity of these compounds. Based on that, this study aims to explore the effects of three sulfated polysaccharides (Heparin, Fucan A e Fucan C) on a murine melanoma model "in vitro". Thus, B16-F10 melanoma cells were cultured and used to evaluate the profile of cytotoxicity and cell viability when exposed to treatments, as well as cell cycle analysis, morphological changes and its migration profile. No cytotoxicity nor genotoxicity were observed. Initially there was no significant decrease in cell viability, nor DNA damage compared to control group. However, when analyzing cell morphology, Fucana C apparently induced a cell spreading and adhesion, as observed by scanning electron microscopy. The ultrastructural analysis performed by transmission electron microscopy showed that heparin treated cells presented a swelling sharp in their mitochondria, a fact that often precedes the apoptosis events. After further analysis to evaluate treatment induced apoptosis, it was observed around 10% of cell death all treated groups. On the other hand, Heparin and Fucan C presented an increase in cells on G2/M phase, probably an attempt to maintain homeostasis as cells undergoing apoptosis stimulates the cells around to proliferate. The higher concentration used induced cell death, and by MTT method we found that apoptosis could occur at doses/times lower than those used in this work. Thus further studies are necessary to determine if low doses of these polysaccharides could have biologic activity against melanoma tumoral cells.

Key words: Melanoma, sulfated polysaccharide, heparin, fucan.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Unidades dissacarídicas dos glicosaminoglicanos .....	15
FIGURA 2 - Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos .....	16
FIGURA 3 – Unidade hexassacarídica básica da heparina .....	17
FIGURA 4 - Distribuição de heparina em diversos tecidos de vertebrados .....	18
FIGURA 5 - Alvo da ação anticoagulante de heparina e heparam sulfato:.....	20
FIGURA 6. Estrutura proposta para uma galactofucana sulfatada extraída de <i>S. schoederi</i> . .....	21
FIGURA 7 – Múltiplos mecanismos para a Síndrome de Trousseau.....	24
FIGURA 8 – Avaliação de viabilidade celular pelo ensaio de vermelho neutro, 24 horas .....	33
FIGURA 9 – Avaliação de viabilidade celular pelo ensaio de Vermelho Neutro, 48 horas .....	34
FIGURA 10 – Análises morfológicas das células B16-F10 expostas aos tratamentos por 24 horas .....	35
FIGURA 11 – Análises morfológicas das células B16-F10 expostas aos tratamentos por 48 horas .....	36
FIGURA 12 – Avaliação Nuclear por 24 horas.....	37
FIGURA 13 – Avaliação Nuclear por 48 horas.....	38
FIGURA 14 – Avaliação Nuclear por 72 horas.....	38
FIGURA 15 – Ensaio de Genotoxicidade .....	40
FIGURA 16 – Morfologia Ultraestrutural .....	41
FIGURA 17 – Ensaio <i>Scratch in vitro</i> . .....	43
FIGURA 18 – Análise do Ciclo Celular.....	44
FIGURA 19 – Anexina-V e 7-AAD.....	46
FIGURA 20 – Análise de Citotoxicidade Celular .....	47

FIGURA 21 – Análise de Citotoxicidade Celular após 48 horas ..... 48

## LISTA DE SIGLAS

AT – Antitrombina

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetil sulfoxide

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EPM – Erro padrão da média

GAG'S – Glicosaminoglicanos

LMP – Baixo ponto de fusão

LMWH – Heparina de baixo peso molecular

MTT - Brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio

PBS – Tampão fosfato

SFB – Soro fetal bovino

TF – Fator Tecidual

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. JUSTIFICATIVA.....	12
1.2. OBJETIVOS .....	13
1.2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	14
2.1. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS .....	14
2.1.1. GLICOSAMINOGLICANOS.....	14
2.1.2. HEPARINA.....	16
2.1.3. FUCANAS.....	20
2.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	22
2.2.1. Síndrome de Trousseau .....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. LINHAGEM CELULAR .....	26
3.2. CONDIÇÕES DA CULTURA DAS CÉLULAS B16-F10 .....	26
3.3. AMOSTRAS DE POLISSACARÍDEOS .....	26
3.4. TRATAMENTO DAS CÉLULAS B16-F10 COM POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	26
3.5. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	27
3.6. GENOTOXICIDADE CELULAR (ENSAIO COMETA).....	28
3.7. ANÁLISE DO CICLO CELULAR .....	29
3.8. ANÁLISE DA MORFOLOGIA NUCLEAR ATRAVÉS DE MARCADOR FLUORESCENTE .....	29
3.9. ANÁLISE EM CITOMETRIA DE FLUXO.....	30

3.10. ANÁLISE DA MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	31
3.11. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	31
3.12. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	32
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1. VIABILIDADE CELULAR.....	33
4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL .....	34
4.3. MARCAÇÃO NUCLEAR COM DAPI.....	37
4.4. AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE .....	39
4.5. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL .....	40
4.6. MIGRAÇÃO CELULAR .....	42
4.7. ANÁLISE DO CICLO CELULAR .....	43
4.8. ENSAIO COM ANEXINA V / 7-AAD.....	45
4.9. ENSAIOS COM MTT.....	47
5. CONCLUSÃO .....	49
.REFERÊNCIAS .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O melanoma destaca-se por ser um tipo de câncer de pele, mas a forma mais agressiva, justamente por possuir uma alta capacidade metastática, o que faz dele um significativo problema na saúde pública mundial. Em estágio avançado, o prognóstico dos pacientes portadores dessa doença é frequentemente de sobrevida em torno de 6 a 9 meses. Sobrevida de cinco anos ocorre em menos de 10% dos casos. Em adição, esse câncer não é responsivo aos tratamentos convencionais, como radioterapia e quimioterapia, que provocam diversos efeitos colaterais e reduz a qualidade de vida do paciente. Face ao exposto, uma estratégia interessante para o combate dessa doença é a utilização de compostos que levam a diminuição da atividade metastática e invasiva das células tumorais, mas com nenhum ou mínimos efeitos colaterais. Neste sentido, destacam-se os polissacarídeos sulfatados, em especial heparina, que é obtida de pulmão ou mucosa intestinal bovina e/ou suína, e as fucanas, obtidas de animais ou algas marinhas. Os dados da literatura indicam que estes compostos apresentam possíveis atividades antitumorais em modelos animais.

### 1.1. JUSTIFICATIVA

A metástase é a causa mais importante de mortalidade no caso de melanoma metastático (PASCO *et al.*, 2004), visto que existe uma dificuldade muito grande de eliminação dos nódulos tumorais formados, além da baixa efetividade dos tratamentos convencionais em uso (THOMPSON *et al.*, 2005). Assim, o presente estudo teve o propósito de avaliar a atividade biológica de heparina não fracionada e de duas fucanas, sobre modelo de melanoma murino “in vitro”.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a ação dos polissacarídeos heparina e fucanas sobre o modelo de melanoma murino “in vitro”.

### 1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- Avaliar se os compostos estudados podem levar a alterações na viabilidade celular, bem como causar genotoxicidade;
- Avaliar se os polissacarídeos são capazes de desencadear alterações no ciclo celular, bem como se podem levar a apoptose;
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais;
- Investigar se o tratamento com os polissacarídeos podem levar a modificações no padrão tumoral das células, como a capacidade proliferativa e de migração.

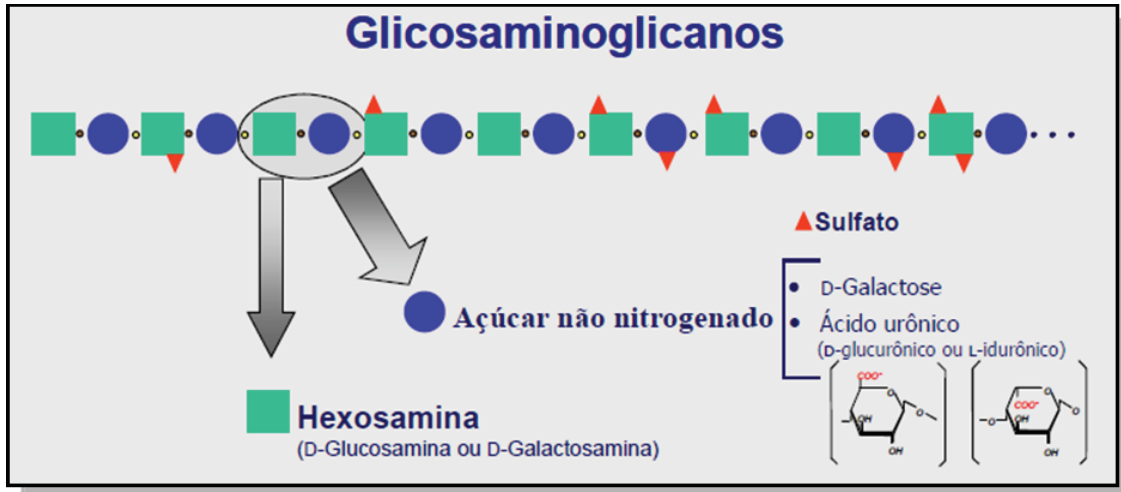


## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

#### 2.1.1. GLICOSAMINOGLICANOS

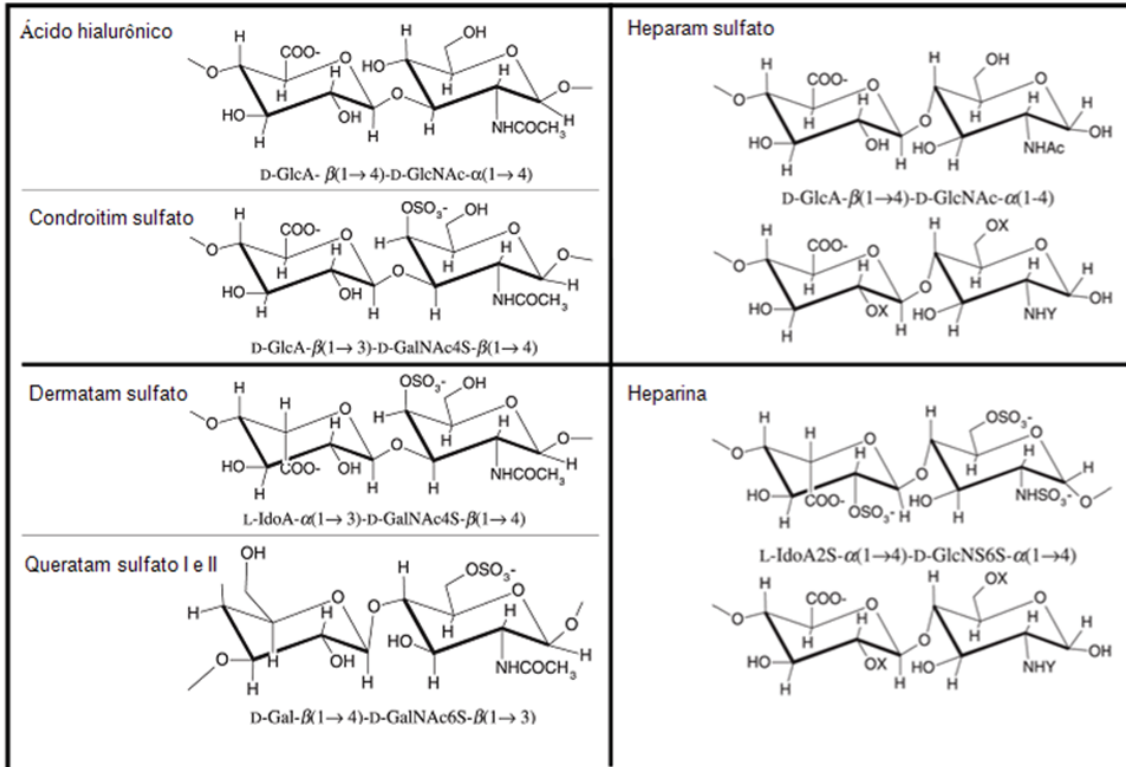
Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polímeros de carboidratos complexos, que interagem com várias proteínas, atuando em muitos processos fisiológicos e patológicos, como na homeostase dos tecidos, inflamações e no processo de progressão de tumores (AFRATIS *et al.*, 2012). Também já foram chamados de mucopolissacarídeos, devido às suas propriedades viscosas e lubrificantes. Estas moléculas estão presentes na superfície de todas as células animais, na matriz extracelular, bem como em grânulos intracelulares de células específicas. Alguns destes compostos são conhecidos por ligarem e regularem uma variedade distinta de proteínas, incluindo citocinas, enzimas, fatores de crescimento e moléculas de adesão (SAMPAIO *et al.*, 2006; GANDHI; MANCERA, 2008; AFRATIS *et al.*, 2012). Quanto a constituição química dos glicosaminoglicanos, observa-se que são formados por unidades dissacarídicas repetitivas, as quais são constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) unida por ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado. Esse, por sua vez, pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-irudônico) ou um açúcar neutro (D-galactose) (GANDHI; MANCERA, 2008; AFRATIS *et al.*, 2012), conforme representado na Figura 1. Os GAGs diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, quanto ao grau de sulfatação e a posição em que são sulfatados, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter- e intradissacarídica (GANDHI; MANCERA, 2008). Os GAGs são polissacarídeos lineares, carregados negativamente e com peso molecular entre 10-100 kDa. Os principais tipos de GAGs são: não sulfatados como o ácido hialurônico, e os sulfatados que incluem condroitins sulfato (CS – sendo 4 e/ou 6 sulfato), dermatam sulfato, queratam sulfato, heparam sulfato e heparina (AFRATIS *et al.*, 2012). A unidade estrutural de cada GAG está representada na Figura 2.



**FIGURA 1 – UNIDADES DISSACARÍDICAS DOS GLICOSAMINOGLICANOS:** A Figura acima ilustra as unidades dissacarídicas dos glicosaminoglicanos, formada por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina), unida por ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-irudônico) ou um açúcar neutro, a D-Galactose.

Os GAGs sulfatados são encontrados com exclusividade no reino animal e apresentam-se amplamente distribuídos na escala filogenética, desde espongiários até mamíferos superiores (MEDEIROS *et al.*, 2000).

Os glicosaminoglicanos possuem papel importante em diversos mecanismos, como na sinalização celular, desenvolvimento de angiogênese, e como agentes anticoagulantes (IOZZO *et al.*, 2001). Acredita-se que essas moléculas participam em processos de migração celular, pois agem como coreceptores para fatores de crescimento. Na verdade, membros da família de fatores de crescimento precisam interagir com cadeias de heparina/heparam sulfato a fim de que seus receptores ativem toda sua sinalização (IOZZO *et al.*, 2001). A superexpressão destes fatores contribui para a progressão de tumores, em caso de metástases.



**FIGURA 2 - UNIDADE ESTRUTURAL DOS GLICOSAMINOGLICANOS:** A Figura acima ilustra a estrutura química dos glicosaminoglicanos. Fonte: Figura adaptada de GANDHI; MANCERA, 2008.

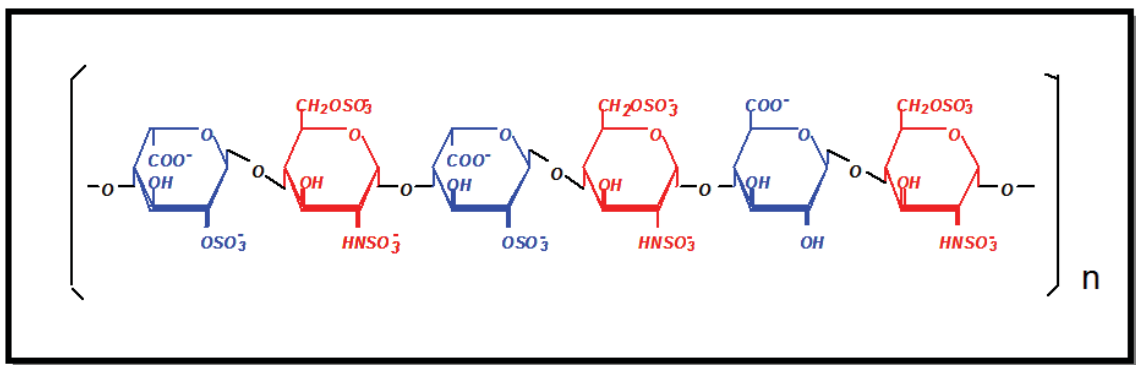
### 2.1.2. HEPARINA

Historicamente a heparina foi descoberta em 1916 por Jay Mclean, quando esse fazia experimentos em extratos de fígado canino, na John Hopkins Medical School (Baltimore, EUA). Mclean buscava o isolamento de fosfolípidos com características procoagulante. Surpreendentemente ele isolou uma substância que possuía um potente efeito anticoagulante. Em 1918 Howell e Holt purificaram outro fosfolípido de fígado de cão, aparentemente distinto daquele isolado por Mclean dois anos antes e cunharam o termo heparina, devido sua origem (do grego hepar = fígado).

Em 1922, Howell desenvolveu outra estratégia de purificação aquosa e em 1926, descreveu sob o mesmo nome de heparina um composto com atividade anticoagulante bem maior que o anterior, extraído também do fígado canino, através de solução aquosa e precipitação por acetona, que possuía ácido glucurônico em

sua composição. Esse composto que é conhecido atualmente como heparina e tem sido utilizado desde a década de 50 (do século passado) como agente anticoagulante de escolha (WARDROP; KEELING, 2008).

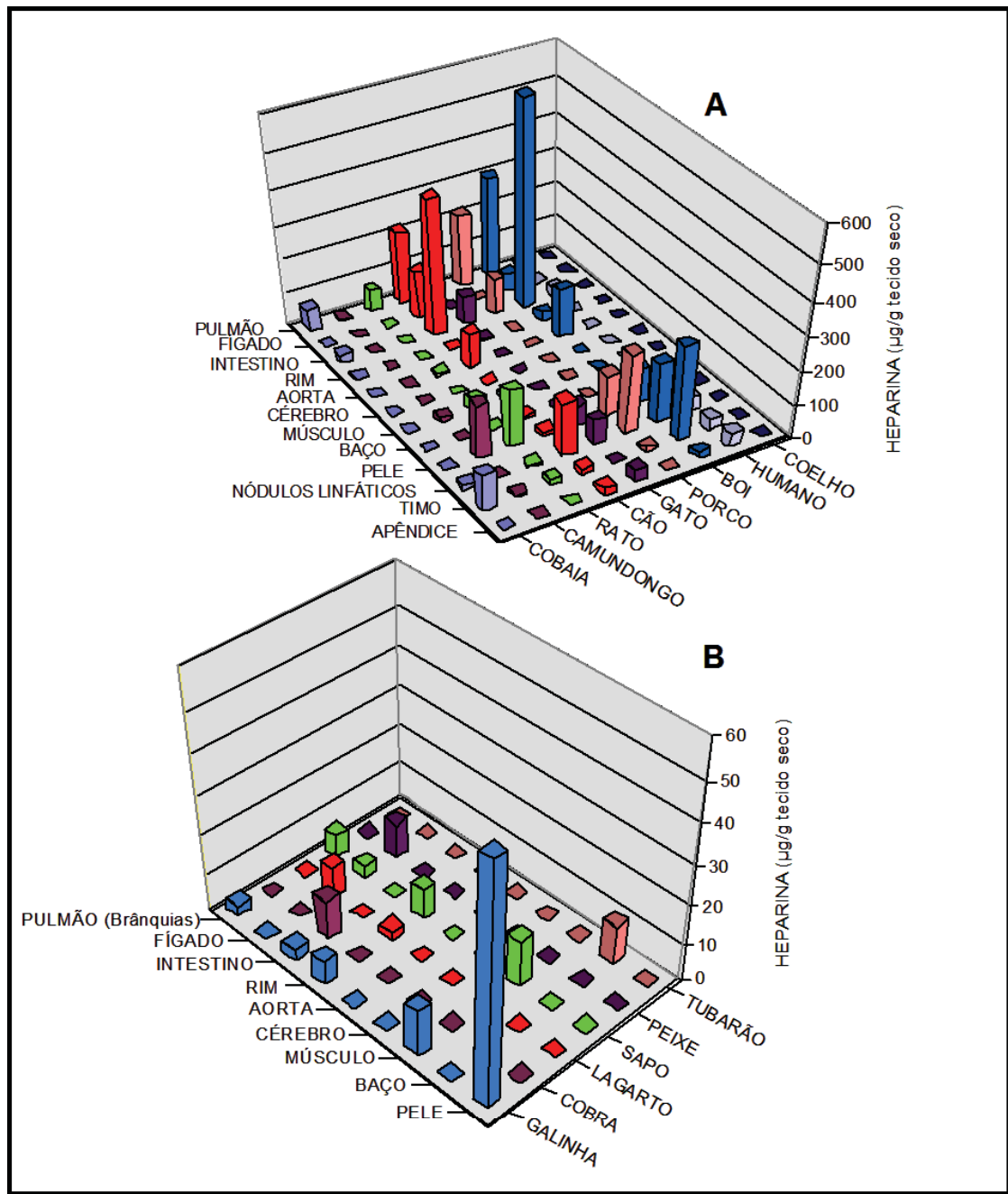
A heparina é um GAG composto por unidades hexassacarídicas octossulfatadas repetitivas, constituída essencialmente de dois tipos de dissacarídeos: um trissulfatado e outro dissulfatado respectivamente, na proporção 2:1 (NADER *et al.*, 2004). Suas cadeias são constituídas de dissacarídeos contendo ácido urônico e  $\alpha$ -D-glicosamina, conforme representado na Figura 3. Os resíduos de ácidos urônicos são do tipo  $\alpha$ -L-idurônicos (70-80%) e  $\beta$ -D-glucurônicos (20-30%), sendo que a maioria dos resíduos de ácido L-idurônico são sulfatados no carbono 2 (C-2, sendo 70-80%), enquanto que o ácido D-glucurônico, raramente encontra-se sulfatado. As ligações glicosídicas intradissacarídicas são do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  ou  $\beta(1\rightarrow4)$  e as interdissacarídicas são do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  (MUÑOZ *et al.*, 2004).



**FIGURA 3 – UNIDADE HEXASSACARÍDICA BÁSICA DA HEPARINA:** A hexosamina da heparina é a  $\alpha$ -D-glicosamina e o açúcar não nitrogenado é o ácido urônico. A Figura acima ilustra a unidade hexassacarídea básica, onde mostra que a heparina é composta principalmente por dois tipos de dissacarídeos, um formado por  $\alpha$ -D-glicosamina, N,6-dissulfatada, unida por ligação  $\alpha(1\rightarrow4)$  ao ácido  $\alpha$ -L-idurônico 2,O-sulfatado, e outro dissacarídeo de  $\alpha$ -D-glicosamina, N,6-dissulfatada, unida ou a um ácido  $\alpha$ -L-idurônico por ligação  $\alpha(1\rightarrow4)$ , ou a um ácido  $\beta$ -D-glucurônico, por ligação do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  (NADER *et al.*, 2004).

A heparina apresenta uma distribuição peculiar, estando presente em mamíferos e outros vertebrados, bem como nos invertebrados. Em geral, está presente em tecidos que apresentam contato direto com o meio externo, tais como: pulmão, pele e mucosa intestinal ou em órgãos responsáveis pela defesa do organismo, tais como o timo e os gânglios linfáticos. Tecidos de origem bovina e canina contêm as maiores quantidades de heparina, enquanto que em tecidos de vertebrados não mamíferos a distribuição da heparina é muito menor. Ressalta-se,

entretanto a ausência de heparina em tecidos de coelho (Figura 4) (NADER *et al.*, 2004).



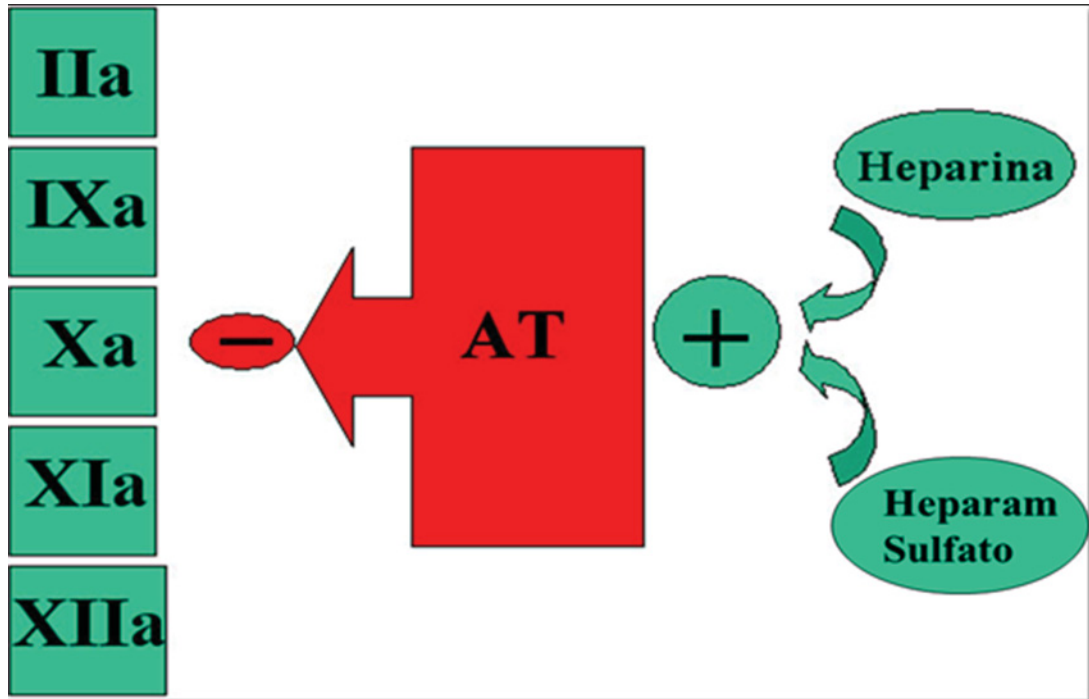
**FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE HEPARINA EM DIVERSOS TECIDOS DE VERTEBRADOS:** A Figura acima ilustra a distribuição da heparina observada em diferentes tecidos estudados, tanto de mamíferos (A), quanto de outros vertebrados (B). A heparina encontra-se preferencialmente em tecidos que estão em contato com o meio externo, tais como pele, pulmão e intestino, ou em órgãos que atuam na defesa do organismo, como timo e gânglios linfáticos. Tal distribuição acontece em relação aos tecidos de diferentes espécies de mamíferos (A), bem como de outros vertebrados (B) Fonte: TRINDADE, 2004.

Apesar de sua conhecida ação farmacológica, acredita-se que sua função biológica pode ser diferente. Durante muito tempo a heparina foi identificada somente no

interior de mastócitos, sob a forma de grânulos secretórios (NADER; DIETRICH, 1989). Atualmente, o proteoglicano contendo heparina já foi localizado em diversos tipos celulares, como macrófagos e células endoteliais (PEJLER; ÅBRINK; WERNERSSON, 2009). O proteoglicano de heparina apresenta muitas funções, mas o seu real papel fisiológico ainda não está esclarecido (NADER; DIETRICH, 1989; ZEHNDER; GALLI, 1999). Os estudos mais recentes indicam um possível efeito como regulador da formação dos grânulos de secreção dos mastócitos (ÅBRINK *et al.*, 2004; PEJLER; ÅBRINK; WERNERSSON, 2009), bem como um efeito ativador do sistema imunológico (ZERNICHOW *et al.*, 2006; KOLSET; TVEIT, 2008).

Dessa forma, acredita-se que seja pouco provável que a função biológica da heparina esteja relacionada à prevenção da coagulação sanguínea. Nesse sentido, foi demonstrado, através de vários estudos, que muitas espécies que não possuem heparina apresentam mecanismos de coagulação sanguínea normais, e outras espécies, que não apresentam sistema de coagulação sanguínea apresentam grandes quantidades de heparina (NADER *et al.*, 2004; SAMPAIO *et al.*, 2006). O que reforça a ideia de que a função biológica desse glicosaminoglicano não está relacionada com o processo de coagulação sanguínea.

A ação farmacológica da heparina está relacionada com a sua alta capacidade anticoagulante. O foco central de sua ação consiste em potencializar a velocidade de inibição da antitrombina (AT), um componente inibidor de diversas enzimas da cascata da coagulação sanguínea (NADER *et al.*, 2004), conforme ilustrado na Figura 5.



**FIGURA 5 - ALVO DA AÇÃO ANTICOAGULANTE DE HEPARINA E HEPARAM SULFATO:** Efeitos anticoagulantes da antitrombina (AT). A Figura acima ilustra a capacidade de potencializar o efeito inibitório da AT pelo heparam sulfato ou pela heparina. Fonte: Franco, 2001.

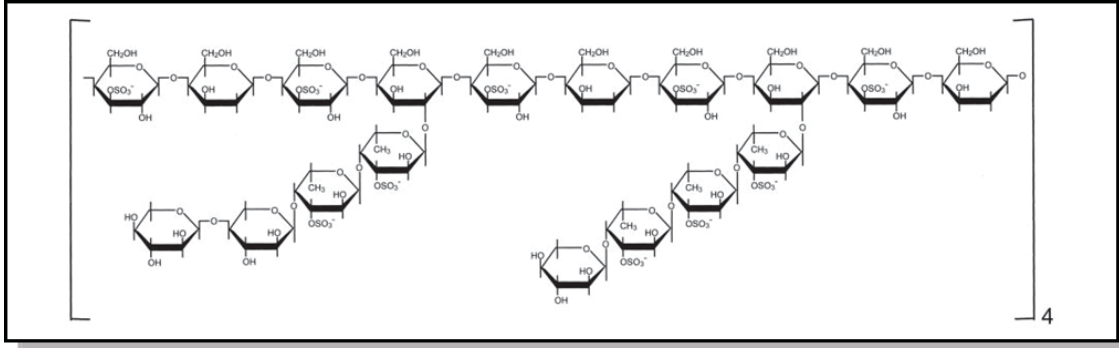
### 2.1.3. FUCANAS

O primeiro polissacarídeo contendo fucose, isolado de alga marrom, foi descrito no início do século passado (KILING, 1913 apud SENE, 2009). Trinta e cinco anos depois foram publicadas evidências de que fucanas também ocorriam em invertebrados marinhos (VASSEUR, 1948 apud SENE, 2009).

Atualmente, polissacarídeos contendo fucose, são denominados de fucanas e são obtidos de algas marrons (Phaeophyceae) (COSTA et al., 2010; ALMEIDA-LIMA et al., 2011) e em equinodermos (ouriços e pepinos do mar) (POMIN; MOURÃO, 2008).

Nas algas elas estão localizadas na matriz mucilaginosa e devido ao seu caráter altamente higroscópico, acredita-se que protejam a alga da desidratação quando essa é submetida a longos períodos de exposição ao sol durante as marés baixas. A natureza mucilaginosa desses compostos, também parece contribuir para tornar a alga flexível o bastante, para crescer em ambiente líquido, e rígida o suficiente para permanecer estendida e assim, melhor captar a luz e os nutrientes existentes (PERCIVAL; MACDOWELL, 1967 apud SENE, 2009).

O polissacarídeo extraído de alga da família das Phaeophyta possui como característica mais marcante a presença de L-fucose sulfatada (COSTA *et al.*, 2010), conforme ilustrado na Figura 6.



**FIGURA 6. ESTRUTURA PROPOSTA PARA UMA GALACTOFUCANA SULFATADA EXTRAÍDA DE *S. schoederi*.** A figura acima ilustra a estrutura observada por RMN da Fucana B, uma galactofucana. FONTE: ROCHA *et al.*, 2005.

As estruturas desses polímeros variam de acordo com a espécie da alga, dando origem a uma grande variedade de polissacarídeos sulfatados (BILAN; USOV, 2008). Cabe salientar que as algas marinhas são as fontes de origem não animal mais importante para a sua extração (COSTA *et al.*, 2010), o que evita contaminação com produtos de origem animal (ROCHA *et al.*, 2005).

As fucanas têm sido avaliadas com relação as suas possíveis atividades farmacológicas através de diversos modelos experimentais. O grande interesse pelas fucanas pode ser relacionado com a sua semelhança estrutural com a heparina, o que daria a esses polissacarídeos atividades semelhantes as dos GAGs. Ainda, por serem de origem vegetal elas poderiam apresentar menores riscos de contaminações por vírus e partículas, como “prions”, quando comparadas com a heparina; além do fato das algas serem recursos naturais renováveis (BERTEAU; MULLOY, 2003).

Diversos autores têm reportado diferentes atividades para as fucanas, como: atividade angiogênica, anticoagulante, antitrombótica, antimigratória, antiadesiva, antioxidante, inibidores *in vitro* de vários vírus, incluindo importantes patógenos humanos tais como o vírus da imunodeficiência humana, herpes e dengue, entre outras (COSTA *et al.*, 2010).

Porém, devido ao fato de muitos estudos de atividade biológica serem conduzidos utilizando preparações “cruas” de fucoidam, torna-se difícil determinar as relações entre atividade e estrutura. Ao longo dos anos, vem se tornando mais claro que ao



menos algumas destas várias atividades descritas não são meramente em função de sua alta carga negativa, mas especificamente pela complexidade estrutural distinta (BERTEAU; MULLOY, 2003).

## 2.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Tumores malignos possuem a capacidade de invasão do tecido subjacente até atingirem vasos sanguíneos, por onde são transportados a outros órgãos, podendo aderir e ali se proliferarem, capacidade esta conhecida como metástase (ALBERTS *et al.*, 2010). Nesse processo é frequentemente observado o desenvolvimento de trombose associada. A metástase é facilitada pela adesão célula-célula, entre as células tumorais e o endotélio de tecidos distantes, para isso, as células tumorais que se encontram na circulação sanguínea utilizam-se da interação com plaquetas e leucócitos, os quais irão contribuir para a adesão do tumor, extravasamento e estabelecimento de novas lesões metastáticas (BENDAS; BORSIG, 2012). Cabe destacar que pacientes com câncer possuem uma predisposição cinco vezes maior para o desenvolvimento de doenças tromboembolíticas (CHAO *et al.*, 2011). Assim, heparina (não fracionada ou heparina de baixo peso molecular - LMWH) é amplamente utilizada para a prevenção e tratamento das complicações tromboembolíticas em pacientes com câncer (KHORANA, 2012, AFRATIS *et al.*, 2012). As observações de pacientes nessas condições, que foram submetidos ao tratamento por heparina ou LMWH, mostraram uma melhora na sobrevida, sugerindo uma atividade antitumoral para esses polissacarídeos (BORSIG, 2010; BENDAS; BORSIG, 2012).

Uma das possibilidades do modo de ação dessas heparinas está na capacidade anticoagulante, uma vez que resulta na liberação do fator tecidual (TFPI) do endotélio vascular, o que contribui para a atividade anti-angiogênica, diminuindo a capacidade invasiva do tumor.

Além disso, cabe ressaltar que a invasão das células tumorais está associada à capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, produzindo enzimas hidrolíticas, tais como metaloproteinases e/ou heparanase. Assim, a atividade antimetastática observada para as heparinas, pode ser causada por suas atividades

biológicas, como inibição da adesão celular mediada por P e L-selectina, bem como da ação das heparanases (AFRATIS *et al.*, 2012).

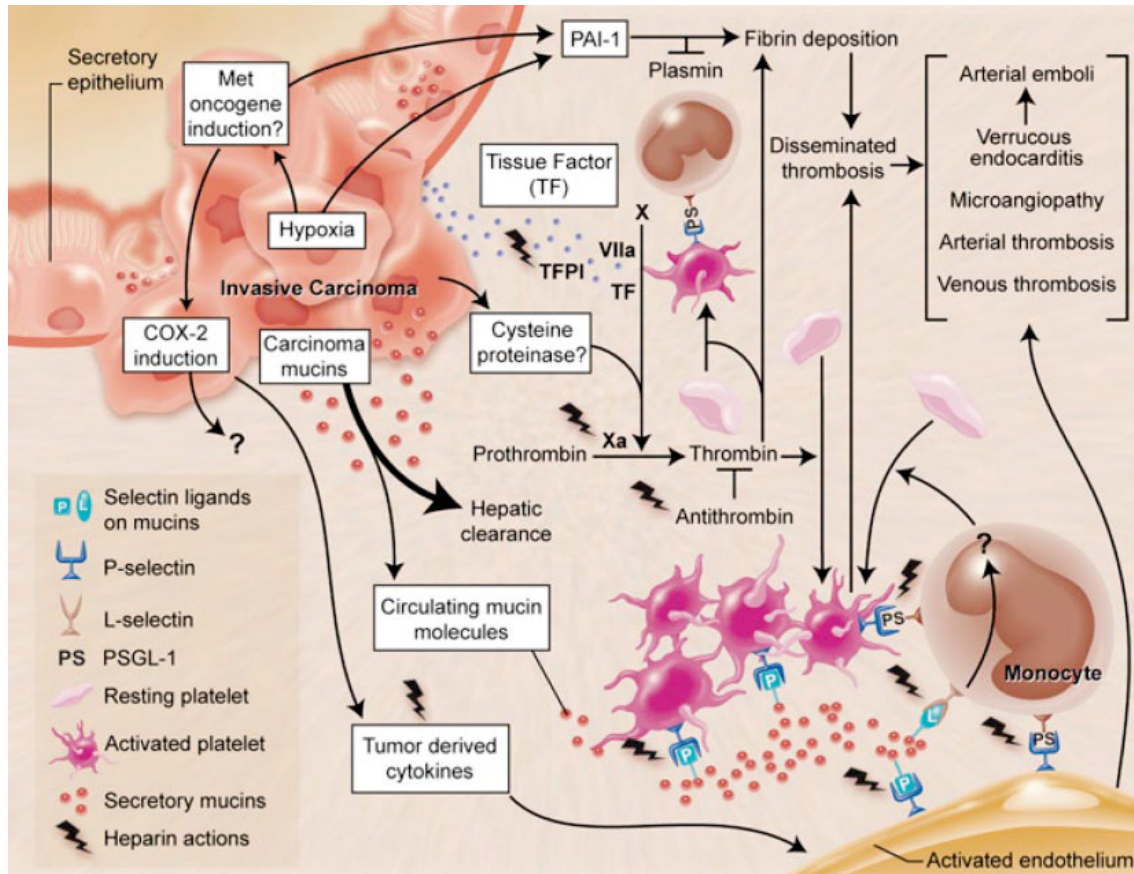
Devido à semelhança estrutural das fucanas com a heparina, uma de suas atividades farmacológicas interessante é a capacidade de inibição na atividade metastática de células tumorais. Acredita-se que essa ação seja resultante da interação desses polissacarídeos com a laminina (molécula da matriz extracelular), inibindo a adesão de células tumorais às mesmas (HAROUN-BOUHEDJA *et al.*, 2002).

### 2.2.1. Síndrome de Trousseau

A síndrome de Trousseau foi descrita em 1865 por Armand Trousseau. Através de diversas observações clínicas, ele notou que pacientes que sofriam de câncer gástrico desenvolviam uma trombose tardia. Trousseau não ficou famoso somente por observar na clínica esse tipo de desordem, e sim por, anos após sua descoberta, autodiagnosticar-se com a doença. A síndrome de Trousseau foi relatada como sendo frequentemente associada à coagulopatia intravascular disseminada crônica, acompanhada por micro trombos ricos em plaquetas, anemia hemolítica angiopática, endocardite verrucosa e problemas tromboembólicos relacionados a esses processos. Atualmente essa síndrome é definida como qualquer desordem tromboembólica que precede um diagnóstico de câncer, ou então que é diagnosticado concomitantemente (VARKI, 2007).

Múltiplos fatores parecem estar associados com o desenvolvimento dessa síndrome, entre eles está a presença excessiva de fator tecidual (TF) na superfície de diversos tipos de células tumorais. O TF é responsável pela ativação de diversas proteases pró coagulatórias, em poros de capilares intratumorais, ou pela invasão de células tumorais no lúmen dos vasos sanguíneos, em caso de tumores metastáticos (RAK *et al.*, 2006). Outro fator que pode levar ao desenvolvimento desse tipo de desordem é a produção de mucinas pelos carcinomas. Mucinas são produtos altamente glicosilados que são secretados por células epiteliais, os quais se tornam aberrantemente glicosilados em células tumorais e são erroneamente secretados na corrente sanguínea, ativando o sistema de coagulação (VARKI, 2007).

Além do TF e das mucinas, diversos outros mecanismos podem estar relacionados com o desenvolvimento dessa síndrome, como a associação do tumor com proteinases cisteínas, entre outros, conforme representado na Figura 7.



**FIGURA 7 – Múltiplos mecanismos para a Síndrome de Trousseau** – A Figura acima representa os múltiplos fatores que podem levar ao desenvolvimento da desordem coagulatória observada por Armand Trousseau. Observa-se na forma de um “raio” os locais de ação da heparina, o que a coloca como sendo um fármaco de escolha para o tratamento desta síndrome. Fonte: VARKI, 2007.

Apesar da existência de diferentes tipos de anticoagulantes presentes no mercado, segundo VARKI (2007), a heparina é o anticoagulante que proporciona melhores resultados para o tratamento desta síndrome, pois além de ativar a antitrombina, também é responsável pela ativação do cofator II e do inibidor da proteína C. Outra ação da administração da heparina é a inibição da ligação das selectinas L- e P-, o que interrompe a ligação das mucinas que dependem das mesmas para ter efeito, conforme representado na Figura 7. O uso prolongado da heparina pode ocasionar diversos efeitos colaterais, como o risco de hemorragias, anemia devido a micro hemorragias intestinais e hemólise, os quais podem variar de acordo com o paciente (AFRATIS *et al.*, 2012).

Devido ao exposto acima, o presente estudo visa avaliar a ação biológica da heparina e seus análogos em modelos de melanoma murino “in vitro”.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. LINHAGEM CELULAR

As células utilizadas nos experimentos foram de melanoma murino, da linhagem B16-F10 (ATCC número CRL-6322).

#### 3.2. CONDIÇÕES DA CULTURA DAS CÉLULAS B16-F10

As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo penicilina 1 U/ml, estreptomicina 1 µg/ml, e anfotericina 2,5 µg/l, em atmosfera úmida a 37° C contendo 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.3. AMOSTRAS DE POLISSACARÍDEOS

No presente trabalho foram utilizados três polissacarídeos, sendo uma heparina e duas fucanas. A heparina utilizada foi comercial da marca Heptar (Eurofarma, São Paulo). As fucanas (Fucana A e Fucana C) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Hugo Rocha, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. São obtidas da alga marinha *S. scröderi* e purificadas conforme descrito previamente por Dietrich e colaboradores (1995).

#### 3.4. TRATAMENTO DAS CÉLULAS B16-F10 COM POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Células B16-F10 foram plaqueadas em diluições ideais para cada experimento e mantidas por 24 horas para entrada na fase log. A seguir, o meio de cultura foi substituído por meio novo e então as células foram tratadas com os polissacarídeos sulfatados por tempo variável de 24 a 72 horas, conforme descrito

em cada ensaio. No final do tratamento, as células foram soltas da placa, pelo tratamento enzimático com tripsina, lavadas com DMEM contendo 10% de SFB, e ressuspensas em PBS.

O efeito dos polissacarídeos foi analisado, quanto a possível ação dose (utilizando concentrações de 0,1; 1; 10 ou 100 µg/ml em meio DMEM sem SFB) ou tempo dependente (24 ou 48 horas) para identificação da concentração ideal, constituindo assim um triagem.

### 3.5. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular, foram empregadas três metodologias diferentes, diferindo o tipo de reação: Vermelho Neutro, MTT, Anexina V e 7-AAD, conforme descrito a seguir:

- **Vermelho Neutro:** O método de Vermelho Neutro foi realizado conforme descrito por Chaim *et al.*, 2006. Para a análise, as células B16-F10 foram contadas em câmara de Neubauer, e plaqueadas 2000 células por poço em placas de 96 poços (TPP). Após 24 horas, as células foram tratadas com os polissacarídeos (Heptar, Fucana A e Fucana C) nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL; com um tempo de tratamento de 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, as células foram incubadas por 2 horas, com uma solução de concentração final de 100 mg/mL de vermelho neutro (SIGMA, N6634). Após o término do tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS, por 3 vezes. Então foi adicionado 100 µL de uma solução eluente (Etanol/Ácido Acético Glacial; 50%/1% em água ultrapura). Homogeneizou-se lentamente, até a completa dissolução e posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância em um comprimento de onda de 550nm, em leitor de microplacas (Meridian ELX800, Diagnostic Inc).
- **Anexina V / 7-AAD:** a Anexina V é uma proteína que se liga em fosfolipídios dependentes de  $Ca^{+2}$  e tem alta afinidade por fosfatidilserina. Vale ressaltar que esse fosfolipídeo é característico da face interna da membrana plasmática e como as células não são permeabilizadas, se houver marcação é porque esse fosfolipídeo foi externalizado, evento que ocorre no início da apoptose. Por outro lado, 7-AAD é um marcador intercalante de DNA que penetra apenas em células com ruptura de membrana. O protocolo foi realizado com o Kit de detecção de

apoptose (BD Pharmingen™) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram analisadas em citometria de fluxo, utilizando FACScalibur do Setor de Ciências Biológicas (UFPR).

- **MTT:** O método do MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por REILLY *et al.* (1998). Para a análise, as células foram expostas a diferentes concentrações de polissacarídeos, conforme descrito anteriormente. No entanto, 3 horas antes do final do tempo de incubação o reagente MTT foi adicionado ao meio de cultura, em uma concentração final de 5 mg/mL em meio DMEM. A seguir, o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados, dissolvidos pela adição de 0,1mL de DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm foi realizada em leitor de microplacas (Meridian ELX800, Diagnostic Inc), utilizando-se como branco a adição do solvente DMSO em células que não receberam MTT e como controle experimental células lisadas com detergente molecular SDS.

### 3.6. GENOTOXICIDADE CELULAR (ENSAIO COMETA)

O ensaio cometa foi realizado segundo método descrito por COLLINS *et al.* 1997. Brevemente, um pellet de  $10^6$  células, provenientes de cada tratamento, foi ressuspenso em 1 mL de soro fetal bovino. Desta solução, 10  $\mu$ L foram retirados e misturados com 120  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP), previamente dissolvida e pré-aquecida (37°C). Esta suspensão celular foi então depositada sobre lâminas cobertas com gel de agarose, preparada com PBS.

Após a deposição da mistura agarose LMP e suspensão celular sobre o gel da lâmina, essa foi então coberta com uma lamínula e levada a geladeira por 15 minutos. Após o período de refrigeração, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas acondicionadas em “cubetas” contendo uma solução de lise por 24 horas.

Decorrido o período de lise celular, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese horizontal e, as mesmas foram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz. Em seguida adicionou-se suavemente uma solução de eletroforese com pH maior que 13, de maneira a cobrir todas as lâminas. Antes do início da

corrida eletroforética, as lâminas permaneceram na solução de eletroforese por 30 minutos para a desespiralização do DNA. A seguir, iniciou-se a corrida de eletroforese a 25 V e 300 mA por 25 minutos.

Terminada a corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e submetidas ao tampão de neutralização (pH 7,5) por 15 minutos. Esse processo foi realizado em três etapas, com 5 minutos para cada. A seguir, as lâminas foram secas a temperatura ambiente, sendo posteriormente fixadas com etanol 96% por 5 minutos.

Com a lâmina seca e fixada, 25  $\mu$ l de brometo de etídeo foi adicionado em cada lâmina para que fosse realizada a coloração do DNA ali presente. Cada lâmina foi então coberta com lamínula e levada ao microscópio de epifluorescência e analisadas com a objetiva de 40x, a óleo.

As lâminas foram analisadas em teste cego, contando-se 100 núcleos em cada lâmina. Os núcleos foram classificados de acordo com o dano, conforme o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. Os núcleos foram classificados em: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo destruído ou em apoptose) (COLLINS *et al.* 1997).

### 3.7. ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Para avaliar se os polissacarídeos alteram o ciclo celular, após a exposição aos polissacarídeos (100 $\mu$ g/mL), por 48 horas, as células foram lavadas e então expostas para iodeto de propídeo (PI) (500  $\mu$ L) para detecção da quantidade de DNA e, conseqüentemente, avaliação das fases do ciclo celular (considerando quantidade X, fase G<sub>0/1</sub>, 2X fase G<sub>2</sub>/M e intermediário entre X e 2X, fase S) conforme descrito pelo fabricante (BD Pharmingen™).

### 3.8. ANÁLISE DA MORFOLOGIA NUCLEAR ATRAVÉS DE MARCADOR FLUORESCENTE

Foram plaqueadas 2000 células B16-F10 em lamínulas de 12 mm de diâmetro, as quais foram mantidas em placa de 24 poços, por 24 horas em incubadora de CO<sub>2</sub>. A seguir, o meio de cultura foi removido e substituído por meio



novo, contendo a concentração de 100 µg/ml dos polissacarídeos em questão. Essa incubação foi mantida por 24, 48 ou 72 horas. Após o período de exposição aos polissacarídeos, as células foram lavadas 2x com meio DMEM livre soro fetal bovino, duas vezes com tampão PBS e fixadas em uma solução contendo 2% paraformaldeído em PBS por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas com PBS (2 vezes) e incubadas com glicina 0,1M em PBS, para bloqueio dos radicais aldeídicos livres, por 15 minutos. A seguir, as células foram novamente lavadas com PBS (2 vezes). Realizado todo esse processo, o núcleo celular foi corado, pela incubação com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1:1000) em PBS, na presença de saponina (0,01%), durante 30 minutos.

Ao término do período de incubação, as células foram lavadas com PBS (2 vezes) e montadas em lâmina histológica com meio de montagem "*Fluoromont-G*" (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) e, então, observadas em microscópio de fluorescência Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

### 3.9. ANÁLISE EM CITOMETRIA DE FLUXO

Células B16-F10 foram plaqueadas ( $4 \times 10^5$ /ml) em placa de Petri (de 60 mm de diâmetro) e mantidas por 48 horas para a entrada na fase log. O meio de cultura foi descartado e substituído por novo, contendo solução de 100 µg/ml polissacarídeo sulfatado e foram mantidos por tempo determinado (conforme descrito acima). No final do tratamento as células foram soltas da placa enzimaticamente ("tripsinizadas"), lavadas com DMEM contendo 10% de SFB, e ressuspensas com PBS. As células foram aliqüotadas em  $10^6$  células por tubo de análise, que foram divididos em para análise de viabilidade e de ciclo celular, conforme descrito anteriormente. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostras em citômetro de fluxo FACSCalibur, através do software CellQuest. Para as médias de cada subpopulação de células e a correspondente significância estatística (ANOVA unifatorial e teste Tukey) foram tabuladas e analisadas para cada tratamento.

### 3.10. ANÁLISE DA MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras celulares ( $5 \times 10^4$ /ml) expostas ou não os polissacarídeos (100 µg/ml) em tempos variáveis, foram fixadas com glutaraldéido 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 durante 2 horas em temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 3 vezes durante 10 minutos cada, e pós fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram lavadas novamente em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 10 minutos cada, e desidratadas em bateria crescente de álcool (50%, 70%, 90% e 100%) de 10 a 20 minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram submetidas ao ponto crítico (CPD 010 - BALZERS), metalizadas com partículas de ouro (SCD-030 – BALZERS) e analisadas em microscópio de varredura (JEOL JSM 6360-LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE).

### 3.11. ANALISE ULTRAESTRUTURAL POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após o período necessário em cultura, as células foram tratadas com a maior concentração dos diferentes tipos de polissacarídeos em estudo (100 µg/mL) em frascos de cultura T75 (TPP) por 48 horas. A seguir, foram fixadas com fixador Karnovsky (2,5% gluteraldeído, 2% paraformaldeído, Cloreto de cálcio 0,02M em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2) por uma hora. Então as células foram raspadas das garrafas de cultivo e centrifugadas, sempre respeitando os grupos, sem misturá-los. Foi realizada então a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, durante uma hora ao abrigo da luz. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1M e desidratação em acetona (70, 90 e 100%), infiltração em mistura de epon: acetona em série decrescente e emblocagem em epon. Após a polimerização em estufa à 60°C por 3 dias, os blocos foram cortados em ultramicrotomo (em intervalos de 0,5 µm), contrastados e observados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EXII, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. As imagens foram

adquiridas através do analisador de imagens Gatan. Foram observados cortes de células em gradinhas de cobre de 300 mesh.

### 3.12. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Um dos métodos de análise, de uma característica muito importante de células tumorais, a capacidade migratória, é através do ensaio de *Scratch in vitro* (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Este tipo de ensaio é aplicável em células de linhagens aderentes. Nessas, quando atingem a confluência é realizado um “risco”, com auxílio de uma ponteira do tipo p10, removendo células na região de confluência, permitindo assim avaliar o perfil migratório da linhagem celular em estudo. A seguir, as células cultivadas em garrafas de cultura do tipo T25 foram tratadas com os diferentes tipos de polissacarídeos, nas maiores concentrações, e fotografadas em microscópio Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), no tempo 0, 3, 6 e 24 horas após o tratamento.

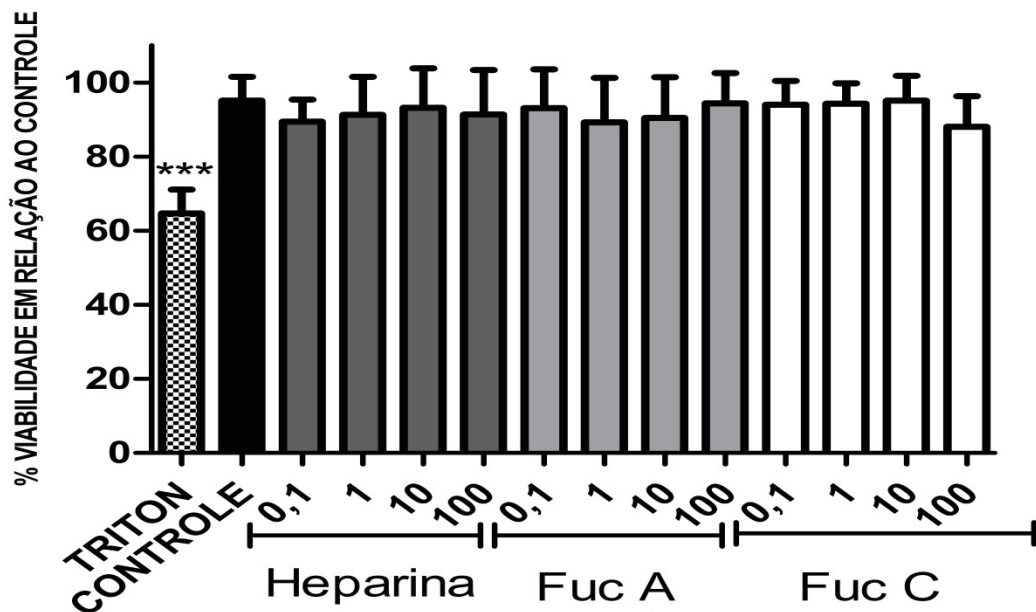
### 3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram submetidos à análise de variância uma via (ANOVA) com pós-teste de Tukey, para um nível de significância de  $p < 0,05$ .

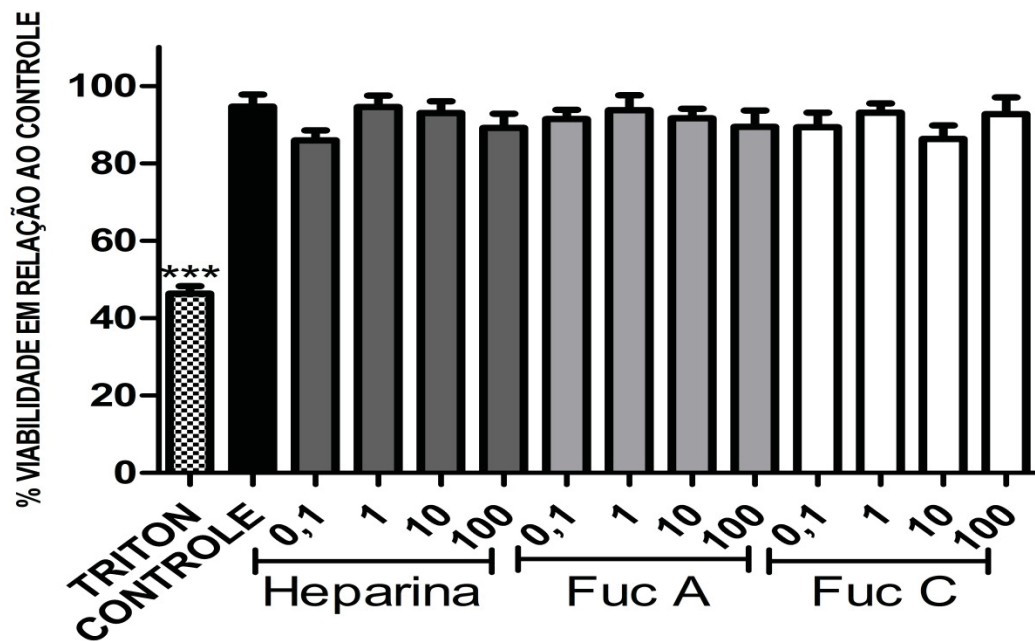
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. VIABILIDADE CELULAR

Para verificar se o tratamento com os polissacarídeos poderiam causar morte celular, as células foram submetidas ao ensaio com Vermelho Neutro. Este é um método utilizado para avaliar quantitativamente a viabilidade de células em cultura baseado na capacidade endocítica das células para incorporar o corante vermelho neutro em seus lisossomos. Para tanto, as células foram submetidas a diferentes concentrações de polissacarídeo (heparina, fucana A e fucana C), variando de 0,1 a 100 µg/ml, por 24 ou 48 horas. Conforme pode-se observar, nas Figuras 8 e 9, o tratamento dose/tempo dependente não apresentou nenhuma diferença estatística significativa, quando comparados com o controle, o que significa que os polissacarídeos em questão não alteram a viabilidade celular.



**FIGURA 8 – Avaliação de viabilidade celular pelo ensaio de vermelho neutro, 24 horas** - Células B16-F10 (2000 células/poço) foram expostas ou não (controle) a diferentes concentrações de polissacarídeos, por 24 horas, e avaliada a viabilidade celular, utilizando o corante vermelho neutro. Triton x-100 (2%) foi utilizado como controle positivo de morte celular e células sem exposição a polissacarídeo foram utilizadas como controle positivo. \*\*\*  $p < 0,05$  (anova univariada seguido por teste de tukey)



**FIGURA 9 – Avaliação de viabilidade celular pelo ensaio de Vermelho Neutro, 48 horas** - Células B16-F10 (2000 células/poço) foram expostas ou não (controle) a diferentes concentrações de polissacarídeos, por 48 horas, e avaliado a viabilidade celular, utilizando o corante vermelho neutro. Triton X-100 (2%) foi utilizado como controle positivo de morte celular e células sem exposição ao polissacarídeo foram utilizadas como controle positivo. \*\*\*  $p < 0,05$  (ANOVA univariada seguido por teste de Tukey)

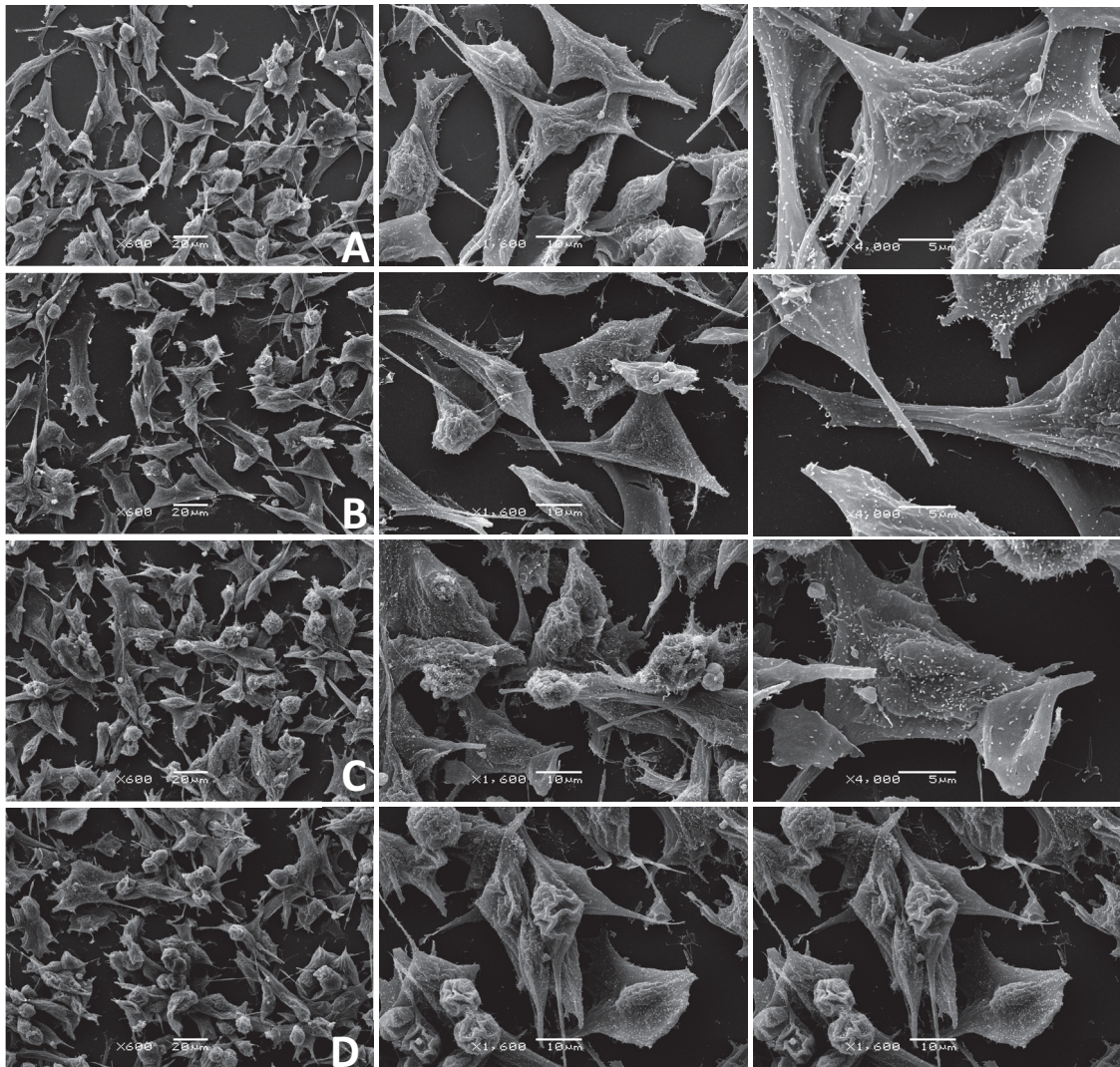
Os resultados utilizando o vermelho neutro mostraram que os polissacarídeos não apresentaram nenhum indício de diminuição da viabilidade celular. Assim, para as etapas seguintes decidiu-se por utilizar a maior dose de tratamento (100 µg/mL).

O próximo passo foi avaliar se esses compostos são capazes de desencadear alterações morfológicas nas células B16-F10.

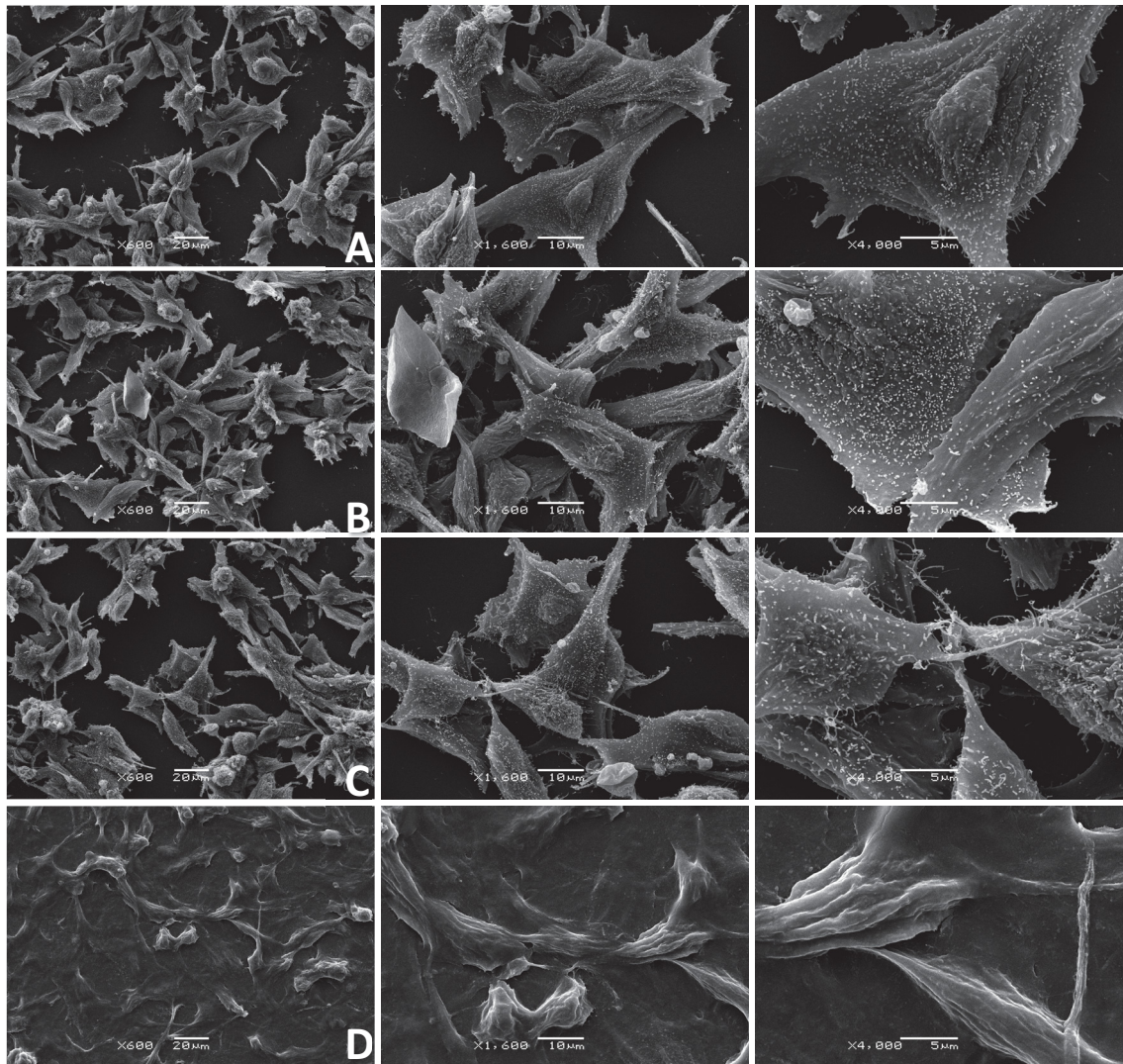
#### 4.2. ANÁLISE ESTRUTURAL

Para avaliar possíveis alterações morfológicas causadas pelos polissacarídeos nas células tumorais, foi empregada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, as células foram expostas a 100 µg/mL dos

polissacarídeos por 24 ou 48 horas, sendo posteriormente processadas e analisadas em MEV. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 10 e 11.



**FIGURA 10 – Análises morfológicas das células B16-F10 expostas aos tratamentos por 24 horas** – As eletromicrografias acima foram obtidas em microscopia eletrônica de varredura, das células que foram expostas ou não (controle – A) a 100  $\mu\text{g/mL}$  de Heparina (B), fucana A (C) ou fucana C (D), por 24 horas em diferentes aumentos. Imagens representativas de um experimento realizado em triplicata.



**FIGURA 11 – Análises morfológicas das células B16-F10 expostas aos tratamentos por 48 horas** – As eletromicrografias acima foram obtidas em microscopia eletrônica de varredura, das células que foram expostas ou não (controle – A) para 100 µg/mL de Heparina (B), fucana A (C) ou fucana C (D), por 48 horas em diferentes aumentos. Imagens representativas de um experimento realizado em triplicata.

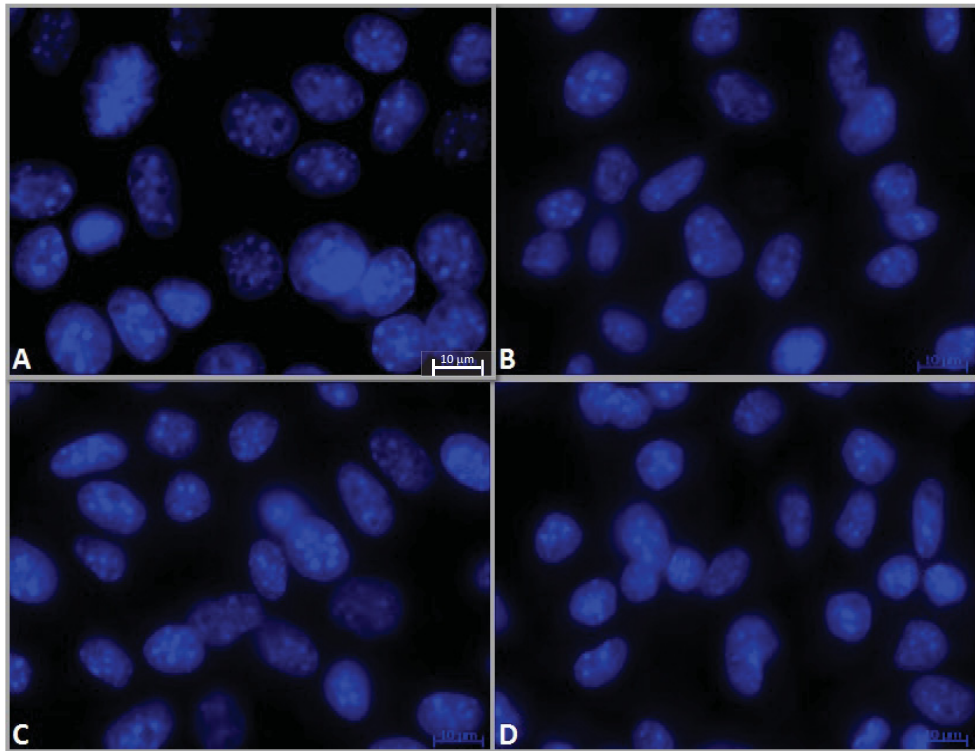
Analisando as eletromicrografias apresentadas nas Figuras 10 e 11, a mudança mais expressiva na morfologia celular foi observada nas células que foram expostas a Fucana C (Figura 11) por 48 horas. Estas apresentaram-se espriadas e mais aderidas à lamínula.

Os dados até aqui mostram que os polissacarídeos não causam morte celular e, exceto a fucana C, também não levam a alterações na morfologia das células tumorais. Assim, o próximo passo foi avaliar se o tratamento poderia levar a alterações internas (nuclear ou citoplasmática).

#### 4.3. MARCAÇÃO NUCLEAR COM DAPI

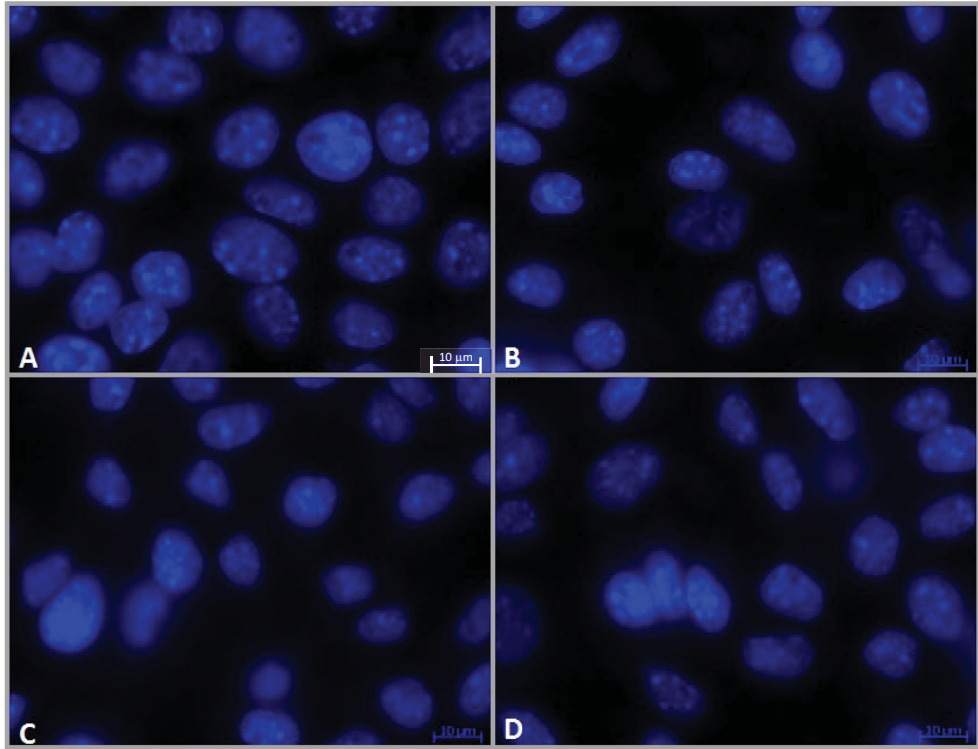
Foi realizada a marcação do DNA celular, utilizando o corante fluorescente 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), o qual liga-se fortemente as regiões A-T do DNA. Através dessa marcação é possível observar a morfologia nuclear, bem como a presença de núcleos picnóticos, os quais aparecem em células em processo de necrose ou em apoptose tardia (ORRENIUS *et al.*, 2010), sendo esse tipo de avaliação muito comum em análises histopatológicas.

Para tanto, as células B16-F10 receberam 100  $\mu\text{g/mL}$  dos diferentes tipos de tratamentos por 24, 48 ou 72 horas. Então foram processadas e observadas em microscópio de fluorescência. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 12, 13 e 14. Não foi observada nenhuma alteração nuclear significativa, bem como a presença de núcleos picnóticos, o que vem de acordo com os dados obtidos anteriormente.

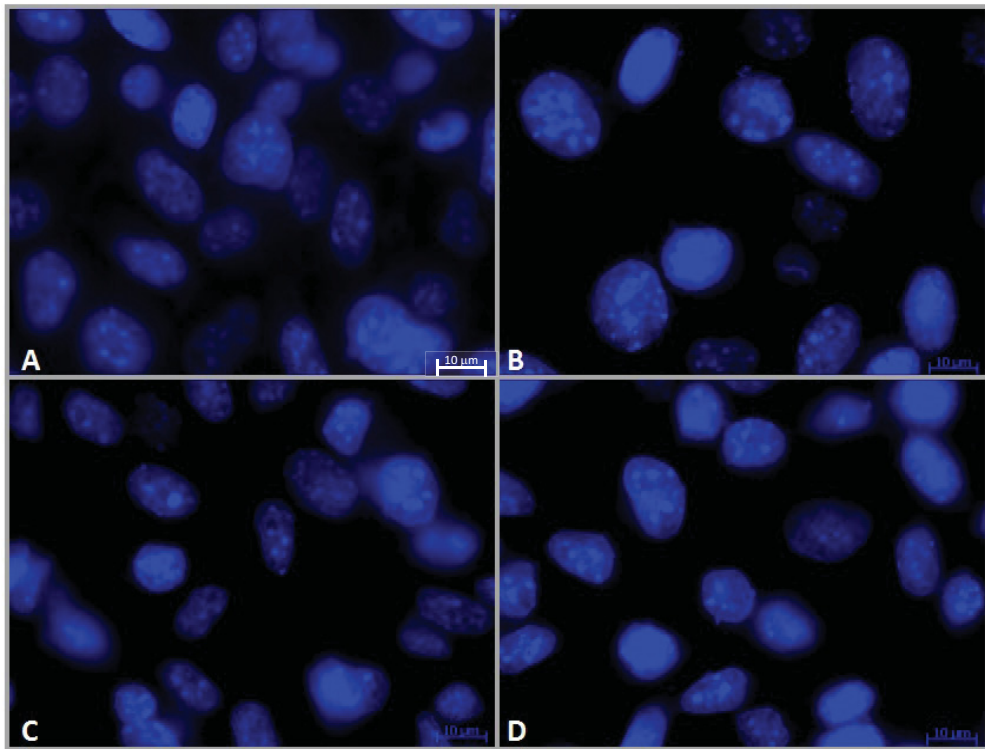


**FIGURA 12 – Avaliação Nuclear após exposição aos polissacarídeos por 24 horas** – Células B16-F10 tratadas com os polissacarídeos por 24 horas e, posteriormente, coradas com DAPI para identificação do núcleo celular. A- Controle, B- Heparina, C – Fucana A e D – Fucana C.





**FIGURA 13 – Avaliação Nuclear após exposição aos polissacarídeos por 48 horas** – Células B16-F10 tratadas com os polissacarídeos por 48 horas e, posteriormente, coradas com DAPI para identificação do núcleo celular. A- Controle, B- Heparina, C – Fucana A e D – Fucana C.



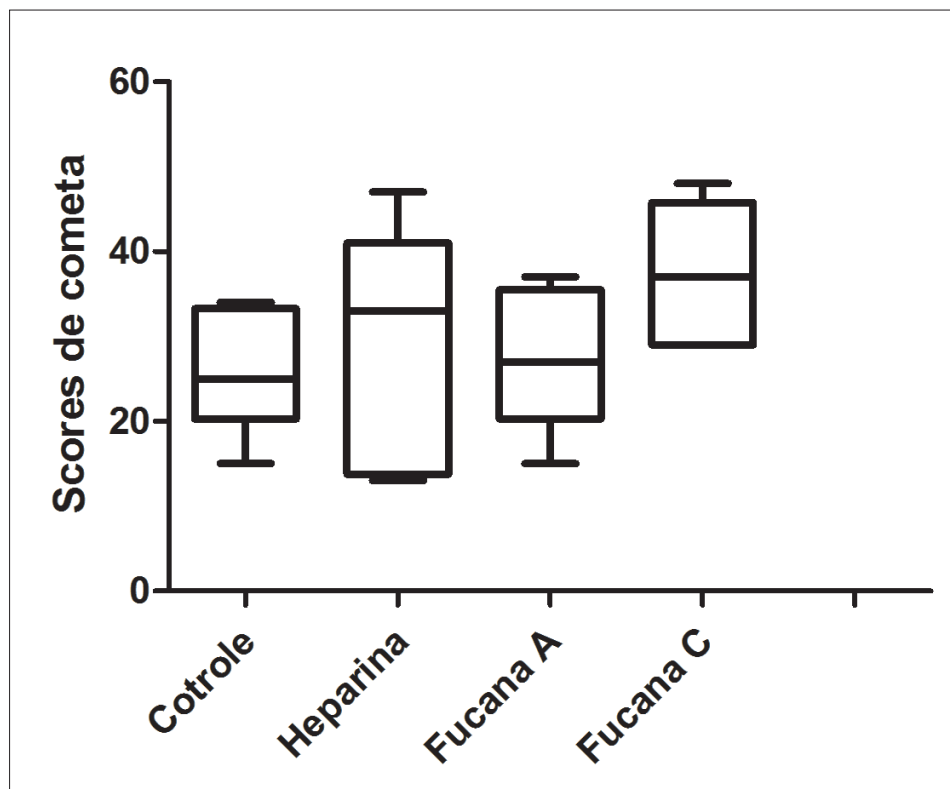
**FIGURA 14 – Avaliação Nuclear após exposição aos polissacarídeos por 72 horas** – Células B16-F10 tratadas com os polissacarídeos por 48 horas e, posteriormente, coradas com DAPI para identificação do núcleo celular. A- Controle, B- Heparina, C – Fucana A e D – Fucana C.

A ausência de alterações morfológicas nuclear é um bom indicio de que os tratamentos realizados com os diferentes tipos de polissacarídeos sulfatados não causam nenhuma alteração no DNA celular, porém, para comprovar isso, foram realizados outros ensaios.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

O próximo passo foi verificar se o tratamento com os polissacarídeos poderiam causar genotoxicidade. O ensaio cometa indica uma possível ação genotóxica através da observação e classificação de danos sofridos pelo DNA. Após tratamento, as células são lisadas e o material genético é obtido. Este material genético é avaliado com os seguintes parâmetros; “score” 0 – sem dano; 1 – dano inicial; 2 – dano médio; 3 – dano grave; 4 – dano máximo. Após processamento das células e corrida eletroforética, em cada amostra foram contados 100 núcleos. Considerando que o máximo de dano ao DNA possui score 4, o maior valor que poderia ser observado é de 400, se todos os 100 núcleos possuíssem o maior dano. Os resultados estão demonstrados na Figura 14.

Observa-se que as células quando expostas por 48 horas, na maior concentração de polissacarídeos (100  $\mu\text{g/mL}$ ), não apresentaram diferença significativa quando aplicado teste estatístico de Kruskal-Wallis, o que indica que os tratamentos não apresentaram ação genotóxica. Assim, o próximo passo foi avaliar possíveis alterações ultraestruturais.



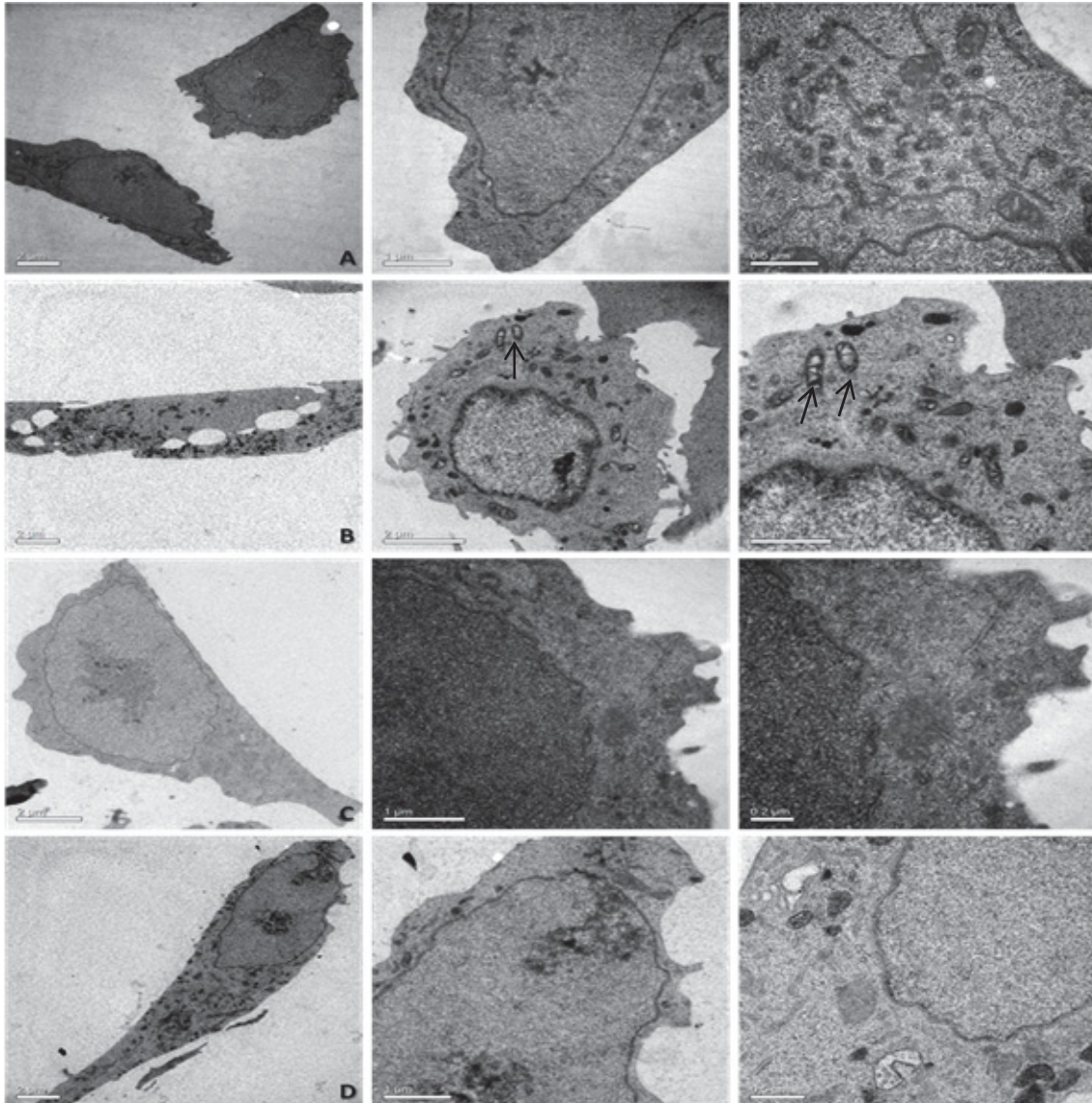
**FIGURA 15 – Ensaio de Genotoxicidade** – Gráfico representativo para a análise de genotoxicidade através do ensaio de cometa, comparando os diferentes tratamentos na concentração de 100 µg/mL por 48 horas.

#### 4.5. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão para avaliar possíveis alterações ultraestruturais, tanto nas estruturas celulares, quanto no material genético organizado no núcleo. Cabe destacar que, através desta técnica, é possível observar alterações que incluem encolhimento celular e nuclear, convolução da membrana nuclear, condensação da cromatina nuclear em massas nitidamente delineadas e vacuolização citoplasmática. Essas alterações morfológicas são indicativas de apoptose e são claramente diferentes daquelas exibidas por células em necrose (DOONAN; COTTER, 2008).

Os resultados estão ilustrados na Figura 16, onde pode-se observar que não ocorrem alteração nuclear significativa, bem como não é observado vacuolização citoplasmática, e nenhum evento característico de apoptose. Por outro lado, o tratamento com heparina fez com que as mitocôndrias alterassem o tamanho,

causando o “swellamento” mitocondrial. Segundo Teranashi e col. (TERANASHI *et al.*, 1999), o “swellamento” é um evento que precede a apoptose, através da liberação do citocromo C no espaço citoplasmático.



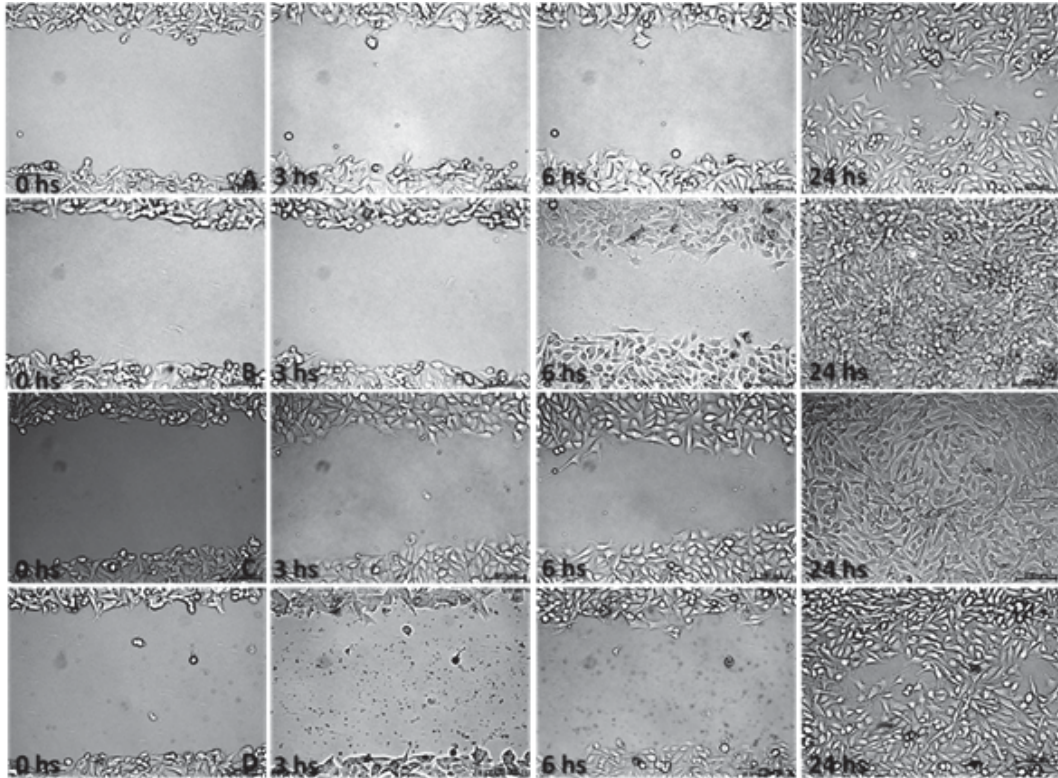
**FIGURA 16 – Morfologia Ultraestrutural após 48 horas de exposição aos polissacarídeos –** Células B16-F10 tratadas ou não (controle - A) por 48 horas, com Heparina (B), Fucana A (C) e Fucana C (D). Imagens representativas de dois experimentos realizados em duplicata. Observe que as células tratadas com heparina estão com as mitocôndrias maiores e bem evidentes, característicos de “swellamento” mitocondrial.

#### 4.6. MIGRAÇÃO CELULAR

Diante dos resultados obtidos, resolveu-se observar se o tratamento com os diferentes polissacarídeos sulfatados poderia alterar o padrão de migração celular. Como já foi citado anteriormente, o melanoma é um tipo de câncer que possui uma alta capacidade metastática. Portanto, qualquer alteração no padrão de migração celular pode indicar uma possível diminuição do padrão metastático.

Para demonstrar como esse padrão de migração acontece, foi realizado o estudo da migração celular, através do experimento de *Scratch in vitro*. Para tanto, foi realizada a observação direta, do padrão de migração celular, numa região que teve as células removidas da placa de cultura (com um risco realizado por uma ponteira). No local onde o risco é feito, células são retiradas, e aquelas vizinhas tendem a migrar para o local vazio. O experimento teve duração de 24 horas, sendo as imagens adquiridas nos tempos 0, 3, 6 e 24 horas, conforme representado na Figura 17.

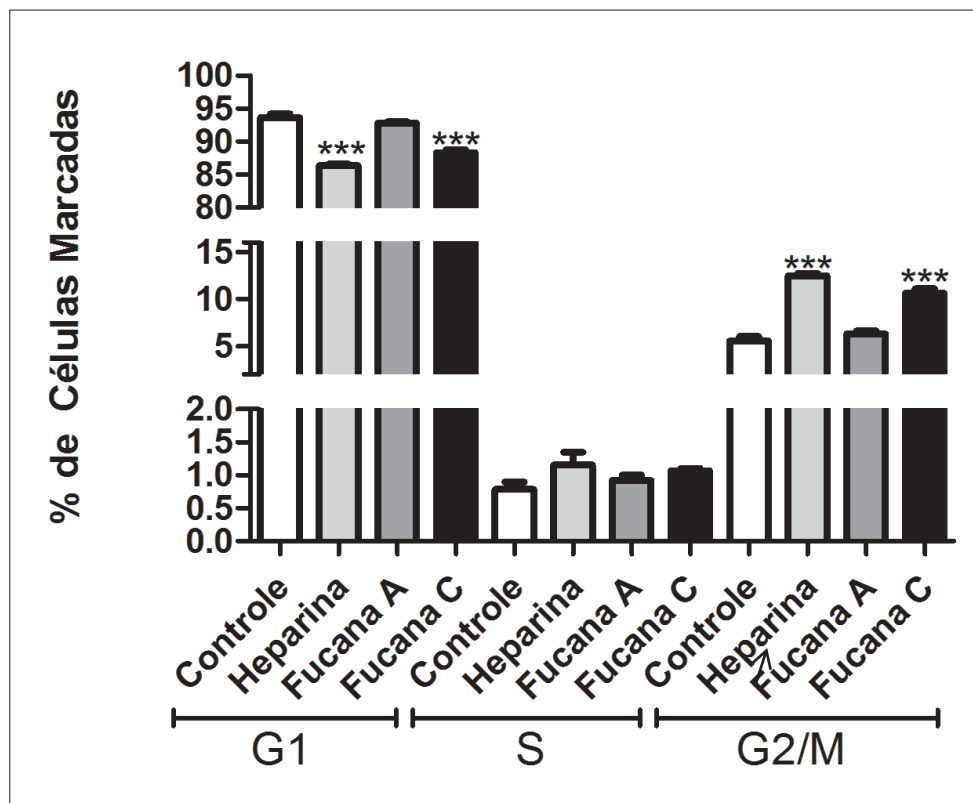
As células que foram expostas a Heparina (B) e Fucana A (C) indicam que o perfil migratório é aumentado, quando comparado com as células controle (A) e Fucana C (D). Outra explicação seria a possibilidade desses dois polissacarídeos terem alterado o perfil proliferativo da célula. Diante disso, o próximo passo foi verificar o perfil do ciclo celular apresentado após o tratamento.



**FIGURA 17 – Ensaio *Scratch in vitro*** – Células B16-F10 tratadas ou não (controle - A) por 24 horas, com Heparina (B), Fucana A (C) e Fucana C (D). Imagens representativas de um experimento onde as imagens foram adquiridas ao longo do tratamento nos tempos 0, 3, 6 e 24 horas. Barra = 100  $\mu$ m.

#### 4.7. ANÁLISE DO CICLO CELULAR

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando a incorporação do iodeto de propídio (PI), o qual intercala com o DNA. Neste ensaio o corante é colocado com as células permeabilizadas, portanto serve para medir a quantidade de DNA, tendo em vista que esta varia durante as fases do Ciclo celular ( $G1 = X$ ,  $G2/M = 2X$  e durante a fase S, o que estiver intermediário, uma vez que é nesse fase que ocorre a duplicação do DNA). Os resultados revelaram um deslocamento para G2/M nas células tratadas com Heparina e Fucana C, durante 48 horas na concentração de 100  $\mu$ g/mL, conforme representado na Figura 18. Isto sugere que há um estímulo para que a células possam se proliferar.



**FIGURA 18 – Análise do Ciclo Celular após exposição aos polissacarídeos** – Gráfico representativo das fases do ciclo celular, através da marcação com iodeto de propídeo (PI/RNase) após a exposição a cada tratamento em uma concentração de 100 µg/mL por 48 horas. \*\*\*  $p < 0,05$  (ANOVA univariada seguido por teste de Tukey)

Uma possibilidade para o aumento no perfil de proliferação das células, é que, quando estas sofrem injúria ou um estímulo para entrar em apoptose, as células vizinhas recebem um estímulo para aumentar a proliferação e ajudar o sistema na manutenção da homeostase (ORRENIUS, 2010), o que estaria de acordo com os dados observados para Heparina no ensaio de migração celular. Além disso, todos os ensaios apresentados até o presente momento foram realizados utilizando somente as células aderidas, porém as células em estágios da apoptose, podem se soltar do seu substrato antes de morrer.

De acordo com o exposto acima, o próximo passo foi realizar um experimento para avaliar apoptose que utilizasse tanto as células aderidas, quanto as que já estivessem em suspensão.

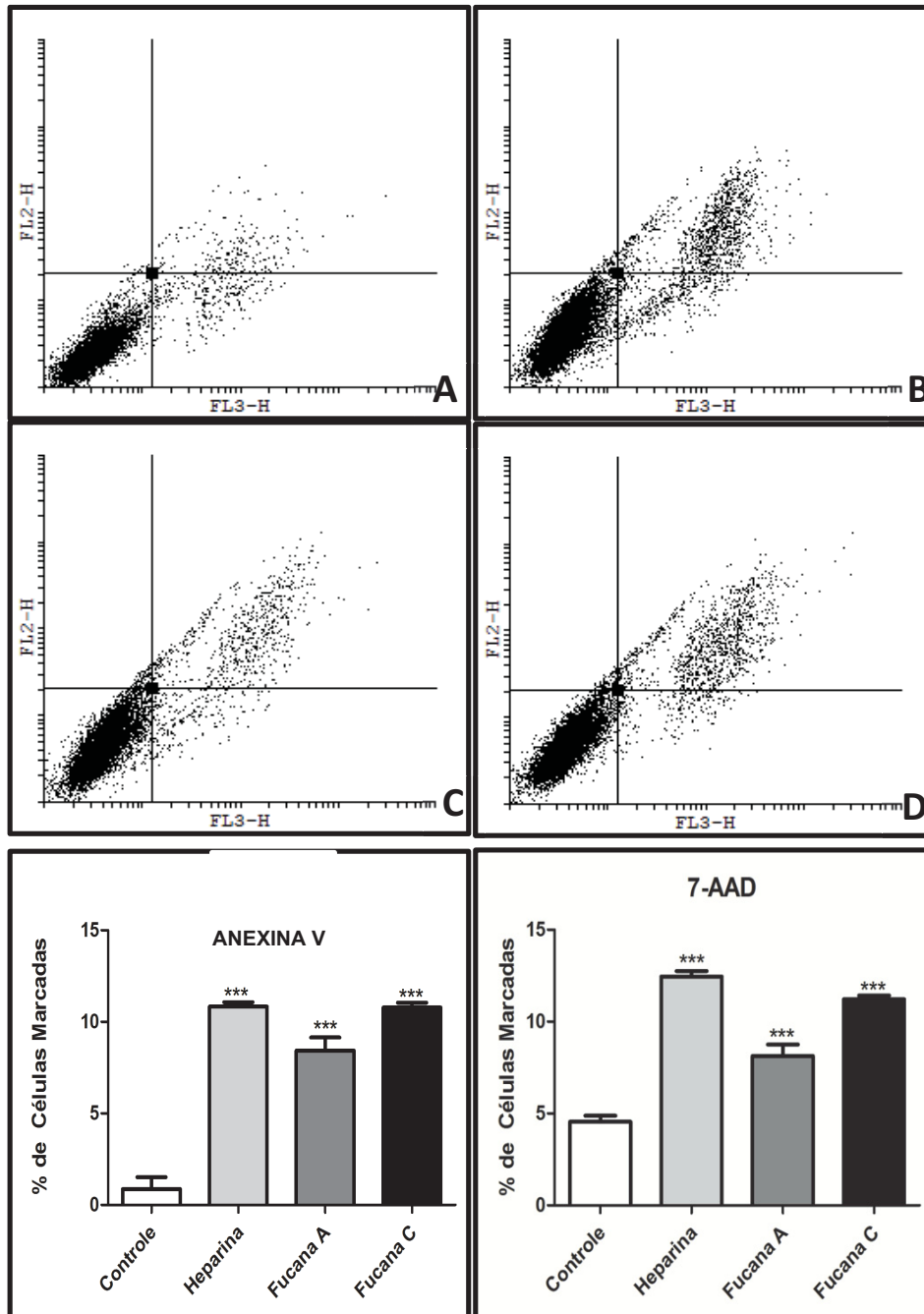
#### 4.8. ENSAIO COM ANEXINA V / 7-AAD

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizada a dupla marcação com Anexina-V e 7-AAD, e posterior análise em citometria de fluxo. Anexina-V é uma proteína que possui alta afinidade pela fosfatidilserina, um fosfolípido característico da face interna da membrana plasmática. No entanto, quando a célula entra em processo de apoptose, um dos primeiros passos é externalizar este fosfolípido. Assim, marcação positiva para Anexina-V indica que a célula está em apoptose. Já o 7-AAD é um intercalante de DNA, que não é capaz de atravessar a membrana plasmática. Desta forma, a marcação positiva para 7-AAD indica que foi possível corar o DNA, o que mostra que a membrana plasmática não está intacta. Isto ocorre quando a célula está em necrose (marcação somente para 7-AAD) ou estágio de apoptose tardia (o que é observado pela dupla marcação, Anexina-V e 7-AAD) (VAN ENGELAND *et al.*, 1996).

Conforme observado na Figura 19, cerca de 10% das células B16-F10, quando expostas por 48 horas para heparina, fucana A ou para fucana C, na concentração de 100 µg/mL, apresentaram dupla marcação para Anexina-V e 7-AAD, indicando que o tratamento pode desencadear apoptose.

Diante dos resultados obtidos com a citometria de fluxo, fez-se necessário outro ensaio para melhorar a análise do perfil citotóxico dos compostos, bem como para o efeito de uma nova triagem.



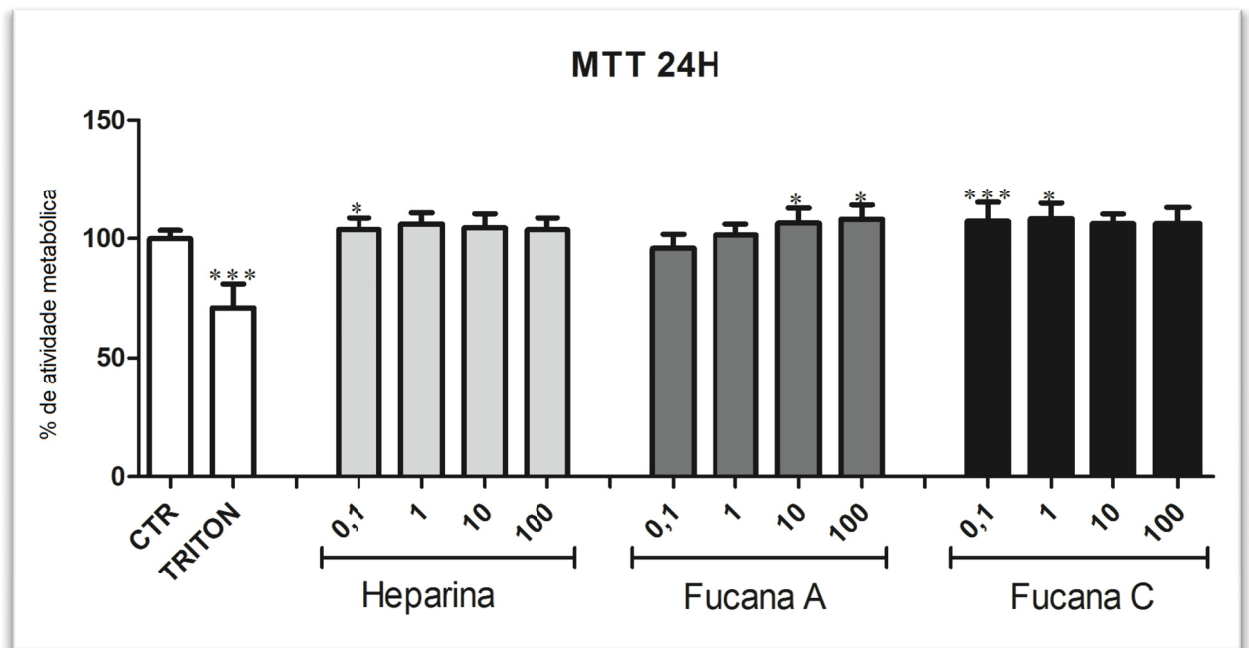


**FIGURA 19 – Anexina-V e 7-AAD – “Dot Plot”** referente à análise por citometria de fluxo para dupla marcação com Anexina-V e 7-AAD de células B16-F10 tratadas com diferentes polissacarídeos. A – Controle, B – Heparina, C – Fucana A e D – Fucana C. Todos os polissacarídeos foram expostos por 48 horas, na concentração de 100 µg/mL. Cabe destacar que esse ensaio discrimina entre células viáveis (Anexina-V -/7AAD -), células em apoptose inicial (Anexina-V +/7AAD -), apoptose tardia (Anexina-V +/7AAD +) e necrose (Anexina-V -/7AAD +).

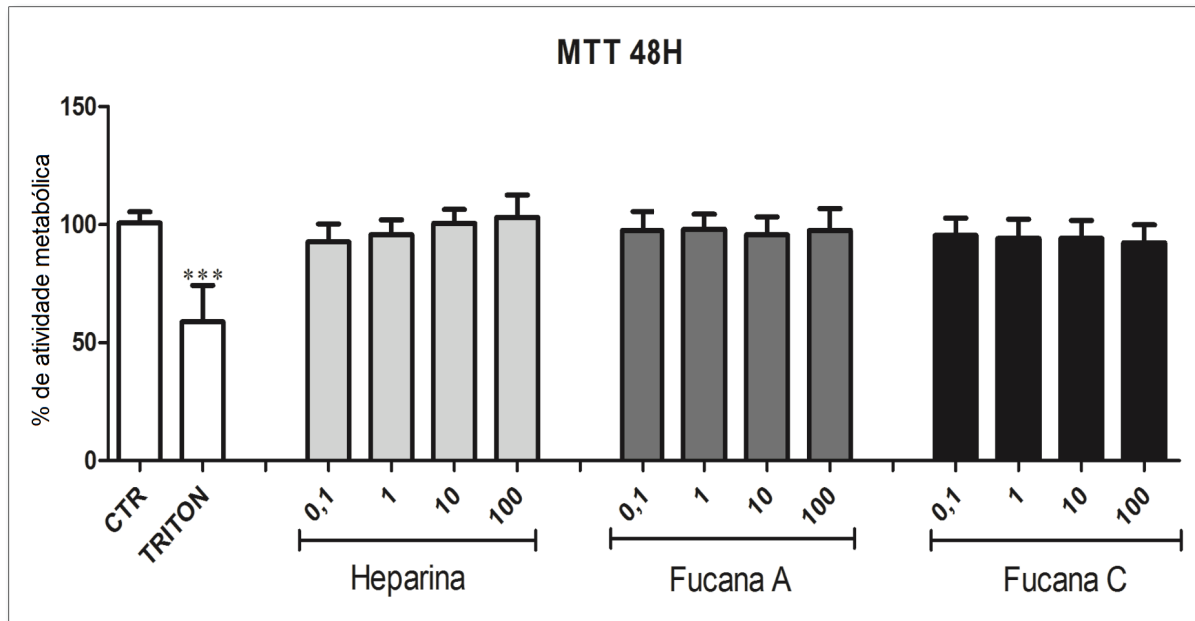
#### 4.9. ENSAIOS COM MTT

Para avaliar se os polissacarídeos em questão apresentam ação citotóxica nas células tumorais, foi realizado a análise utilizando o ensaio de MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio), pois trata-se de um ensaio rápido, realizado para avaliar a resistência a drogas (PIETERS *et al.*, 1990). O MTT é um sal de tretazólio de cor amarela, o qual é convertido no sal de formazam, de cor roxa, pela ação da succinato desidrogenase que age ao longo da cadeia respiratória mitocondrial. Portanto, somente células com mitocôndrias ativas são capazes de metabolizar o MTT (HATOK *et al.*, 2009).

Assim, as células foram submetidas a diferentes concentrações de polissacarídeos (Heparina, Fucana A e Fucana C), variando de 0,1 a 100 µg/mL, por 24 ou 48 horas e os resultados estão ilustrados nas Figuras 20 e 21.



**FIGURA 20 – Análise de Citotoxicidade Celular** após 24 horas de exposição aos Polissacarídeos – Gráfico representativo de três experimentos independentes, em triplicata, decorrentes da exposição das células B16-F10 a Heparina, Fucana A ou Fucana C, nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL por 24 horas e análise pelo ensaio bioquímico de MTT. \*\*\*  $p < 0,05$  (ANOVA univariada seguido por teste de Tukey)



**FIGURA 21 – Análise de Citotoxicidade** Celular após 48 horas de exposição aos Polissacarídeos – Gráfico representativo de três experimentos independentes, em triplicata, decorrentes da exposição das células B16-F10 a Heparina, Fucana A ou Fucana C, nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL por 48 horas e análise pelo ensaio bioquímico de MTT. \*\*\*  $p < 0,05$  (ANOVA univariada seguido por teste de Tukey)

De acordo com os dados apresentados na Figura 20, pode-se verificar que os polissacarídeos Heparina, na concentração de 0,1 µg/mL, Fucana A, nas concentrações de 10 e 100 µg/mL e Fucana C, nas concentrações de 0,1 e 1 µg/mL, quando expostos por 24 horas, apresentaram aumento da atividade enzimática, o que sugere um maior perfil proliferativo quando comparados ao controle experimental. Observe que os dados da Fucana C, na concentração de 0,1 µg/mL, apresentaram maiores alterações significativas. Esse possível perfil de alteração proliferativa pode indicar uma ação apoptótica dos compostos, já que células em apoptose estimulam as circundantes a se proliferarem (ORRENIUS, 2010). Entretanto, quando observa-se os dados apresentados na Figura 21, nota-se que quando as células são expostas durante 48 horas à ação dos polissacarídeos sulfatados, nenhuma alteração foi observada.

Devido ao resultado obtido através do ensaio de MTT, observou-se que mesmo em doses mais baixas durante um menor período de tempo, poderiam apresentar um melhor resultado aos tratamentos propostos. Assim, novos ensaios são necessários utilizando menores concentrações de polissacarídeos.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através dos ensaios de Vermelho Neutro e Cometa indicaram que os tratamentos realizados com os diferentes polissacarídeos sulfatados não alteram a viabilidade das células, bem como não causam dano ao seu DNA.

A marcação com o corante fluorescente DAPI, comprovou esses resultados, pois não foram encontrados núcleos picnóticos.

Em MEV observou-se que somente a Fucana C, após o período de exposição de 48 horas, levou à maior aderência celular.

A análise ultraestrutural, através da microscopia eletrônica de transmissão, revelou um inchaço mitocondrial evidente nas células que receberam o tratamento com heparina, que é um evento característico que precede a apoptose.

O tratamento com heparina e fucana A levam a alteração no padrão de migração, possivelmente decorrente do aumento no perfil proliferativo das células, observados com o deslocamento para as fases G2/M do ciclo celular.

Quando avaliou-se células aderidas, juntamente com células soltas, observou-se que cerca de 10% dessas estão em apoptose, causadas pelos polissacarídeos utilizados, após 48 horas de exposição.

O ensaio de citotoxicidade por MTT demonstrou que as células expostas à Heparina na concentração de 0,1 µg/ml, Fucana A nas concentrações de 10 e 100 µg/ml e Fucana C nas concentrações de 0,1 e 1 µg/ml durante 24 horas apresentaram um maior perfil metabólico, o que sugere um efeito proliferativo decorrente de ação apoptótica dos compostos em um menor tempo e em menores concentrações.

Diante de todos os resultados obtidos até o momento e do exposto acima, novos estudos devem ser realizados para avaliação utilizando menores doses e em diferentes períodos de exposição.

## REFERÊNCIAS

- ABRINK, M.; GRUJIC, M.; PEJLER, G. **Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule.** J Biol Chem. 279:40897-905, 2004.
- AFRATIS, N. *et al.* **Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment.** FEBS Journal, 279(7):1177-97, 2012.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da Célula**, 5ª ed., páginas 1205-1223. Porto Alegre: Art Med, 2010.
- ALMEIDA-LIMA, J. *et al.* **Evaluation of acute and subchronic toxicity of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan from the *Spatoglossum schröederi* in Wistar rats.** Rev. Bras. Farmacogn., 21(4): 674-79, 2011.
- BILAN, M. I.; USOV, A. I. **Structural analysis of fucoidans.** Nat prod commun; 3:1639-48, 2008.
- BENDAS, G.; BORSIG, L. **Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and The Inhibitory Potential of Heparins.** Int. J Cell Biol., 2012, 2012.
- BERTEAU O, MULLOY B. **Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide.** Glycobiology, 13(6):29-40, 2003.
- BORSIG, L. **Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence.** Thrombosis Research. 125 Suppl 2:S66-71, 2010.
- CHAIM, O.M. *et al.* **Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity.** Toxicol. App. Pharmacol. 15;211(1):64-77, 2006.
- CHAO, BO H. *et al.* **Clinical Use of the Low-Molecular-Weight Heparins in Cancer Patients: Focus on the Improved Patient Outcomes.** Thrombosis, 2011, 2011.
- COLLINS, A. *et al.* **Comet assay in human biomonitoring studies: Releability, Validation, and aplications.** Environmental and Molecular Mutagenesis, 30(2):139-46, 1997.
- COSTA, L. S. *et al.* **Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds.** Biomedicine & Pharmacotherapy, 64(1):21-8, 2010.
- DIETRICH, C. P. *et al.* **A New Approach For The Characterization Of Polysaccharides From Algae: Presence Of Four Main Acidic Polysaccharides In Three Species Of The Class Phaeophyceae.** Plant Science. 108(2):143-53, 1995.

- DOONAN, F.; COTTER, T. G. **Morphological assessment of apoptosis.** *Methods*, 44(3):200-4, 2008.
- FRANCO, R. F. **Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis.** *Medicina, Ribeirão Preto*, 34:229-37, 2001.
- GANDHI, N. S.; MANCERA, R. **The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins.** *Chem. Biol. Drug Des*, 72(6):455-82, 2008.
- HAROUN-BOUHEDJA, F. **In vitro effects of fucans on MDA-MB231 tumor cell adhesion and invasion.** *Anticancer Res.*, 22(4):2285-92, 2002.
- HATOK, J. **In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells.** *Clin Exp Med.*, 9(1):1-7, 2009.
- IBRAHIM, N.; HALUSKA, F.G. **Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms nageatte.** *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 4: 551-579, 2009.
- IOZZO, R. V. **Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions.** *J. Clin. Invest.* 108: 165-7, 2001.
- KHORANA, A. A. **Coagulation and Cancer.** *Am. J. of Hematol. Suppl* 1:S82-7, 1987  
Epub 2012
- KOLSET, S. O.; TVEIT, H. **Serglycin--structure and biology.** *Cell Mol Life Sci.*, 65(7-8):1073-85, 2008.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cells migration in vivo.** *Nat Protoc.*, 2(2):329-33, 2007.
- MEDEIROS, G. F. *et al.* **Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1475(3):287-94, 2000.
- MUÑOZ, E. M.; LINHARDT, R. J. **Heparin-binding domains in vascular biology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(9):1549-57, 2004.
- NADER, H. B. & DIETRICH, C. P. **Natural occurrence and possible biological role of heparin.** In: Lane DA and Lindahl U (Editors), *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications.* Edward Arnold Publishers, London, 1989.
- NADER, H. B. *et al.* **Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities.** *Current Pharmaceutical Design*, 10(9):951-66, 2004.
- ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B. **Cell Death and their implications in toxicology.** *Toxicological Sciences*, 119(1):3-19, 2010.

- PASCO, S. *et al.* **Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules.** Crit. Rev. in Oncol. Hematol., 49(3):221-33, 2004.
- PEJLER, G.; ABRINK, M.; WERNERSSON, S. **Serglycin proteoglycan: regulating the storage and activities of hematopoietic proteases.** Biofactors, 35(1):61-8, 2009
- PIETERS, R. *et al.* **In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions.** Blood, 76(11):2327-36, 1990.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. **Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans.** Glycobiology, 18(12):1016-27, 2008.
- RAK, J. *et al.* **Oncogenes, Trousseau Syndrome, and Cancer-Related Changes in the Coagulome of Mice and Humans.** Cancer Res, 66(22):10643-6, 2006.
- REILLY, T. P. *et al.* **Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone.** Biochem Pharmacol, 55(6):803-10, 1998.
- ROCHA, H. A. O. *et al.* **Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent?** J. of Biol. Chem., 280(50):41278-88, 2005.
- SAMPAIO, L.O. *et al.* **Heparins and heparans sulfates. Structure, distribution and protein interactions.** In: VERLI H (Ed), Insights into carbohydrate structure and biological function. Transworld Research Network, Kerala, p. 1-24
- SENE, R. V. **Polissacarídeos sulfatados minimizam os efeitos do veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*) em células endoteliais.** Dissertação (mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, 2009.
- TERANASHI, M. A. *et al.* **Two types of the enlargement of mitochondria related to apoptosis: simple swelling and the formation of megamitochondria.** J. Society of Electron Micros, 48(5):637-51, 1999.
- THOMPSON, J.F, SCOLYER, R. A, KEFFORD, R.F. **Cutaneous melanoma.** Lancet, 365(9460):687-701, 2005.
- TRINDADE, E. S. **Caracterização do mecanismo de estímulo da síntese do proteoglicano de heparam sulfato em células endoteliais, pela heparina.** São Paulo. Tese (doutorado em Ciências - Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Paulo, 2004.
- VAN ENGELAND *et al.* **A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture.** Cytometry. 1;24(2):131-9, 1996.

**VARKI, A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms.** Blood, 110(6):1723-9, 2007.

**WARDROP, D.; KEELING, D. The story of the Discovery of heparin and warfarin.** Br. J. of Haematol, 141(6):757-63, 2008.

**ZEHNDER, J.L.; GALLI, S.J. Mast-cell heparin demystified.** Nature, 400(6746):714-5, 1999.

**ZERNICHOW, L. *et al.* Serglycin is the major secreted proteoglycan in macrophages and has a role in the regulation of macrophage tumor necrosis factor-alpha secretion in response to lipopolysaccharide.** J Biol Chem.,281(37):26792-801, 2006.