

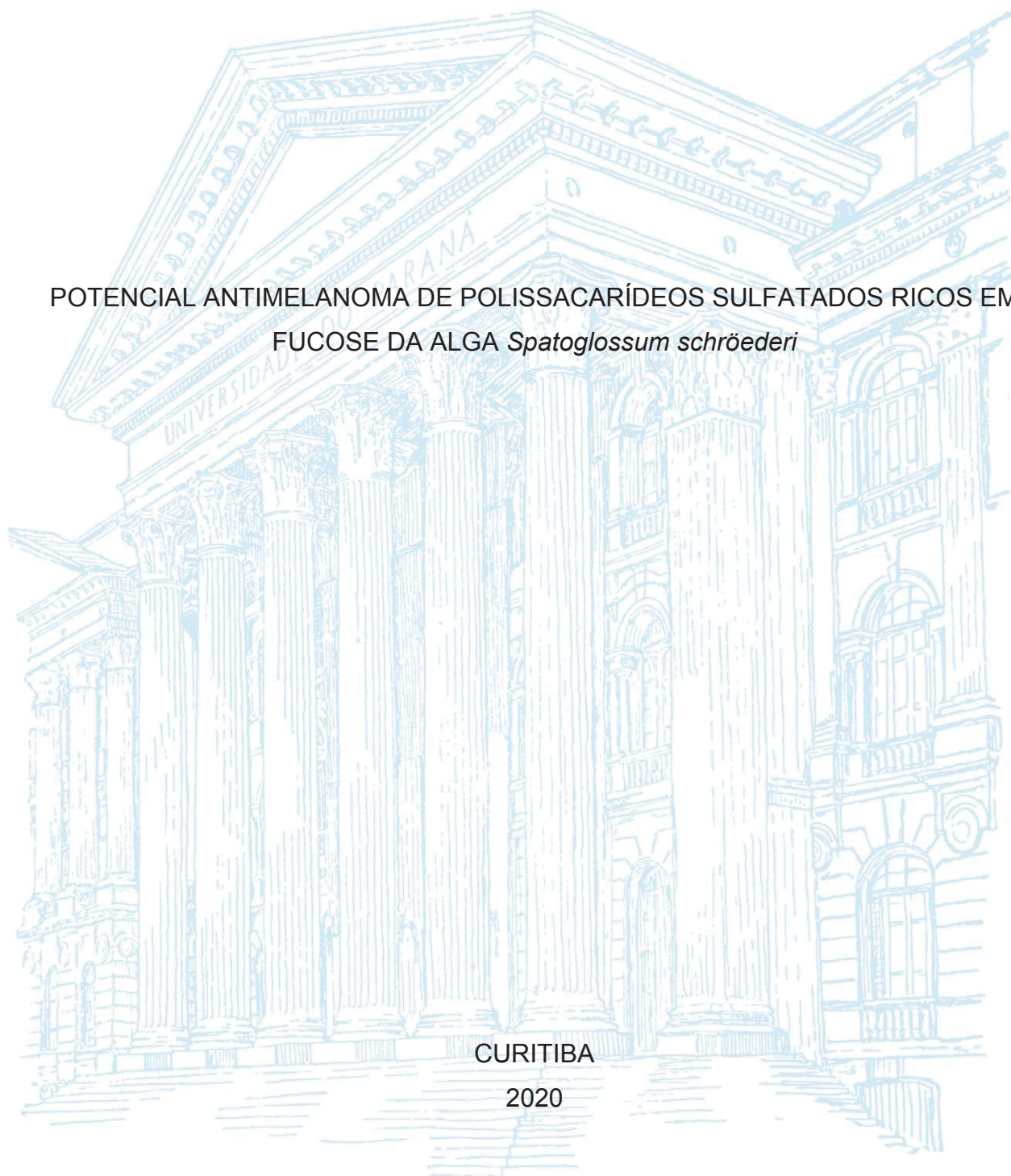
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAÍRA BARBOSA E REIS

POTENCIAL ANTIMELANOMA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS RICOS EM
FUCOSE DA ALGA *Spatoglossum schröederi*

CURITIBA

2020



MAÍRA BARBOSA E REIS

POTENCIAL ANTIMELANOMA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS RICOS EM
FUCOSE DA ALGA *Spatoglossum schröderi*

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

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Camargo de
Oliveira

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Reis, Máira Barbosa e.

Potencial antimelanoma de polissacarídeos sulfatados ricos em fucose da alga *Spatoglossum Schröderi*. / Máira Barbosa e Reis. – Curitiba, 2020.
109 f. : il.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade.

Coorientadora: Carolina Camargo de Oliveira.

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

1. Pele - Tumores. 2. Melanoma. 3. Polissacarídeos. 4. Fucana sulfatada. 5. Câncer – Tratamento. 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.) 616.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MAÍRA BARBOSA E REIS** intitulada: **POTENCIAL ANTIMELANOMA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS RICOS EM FUCOSE DA ALGA SPATOGLOSSUM SCHRÖEDERI**, sob orientação do Prof. Dr. EDVALDO DA SILVA TRINDADE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Junho de 2020.

Assinatura Eletrônica
04/07/2020 01:12:18.0
EDVALDO DA SILVA TRINDADE
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
03/07/2020 15:29:36.0
GUILHERMINA RODRIGUES NOLETO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
02/07/2020 13:23:23.0
FRANCISCO FILIPAK NETO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
04/07/2020 22:36:40.0
ANDREA SENFF RIBEIRO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
02/07/2020 15:14:17.0
LUCIANE REGINA CAVALLI
Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)

Dedico este trabalho à minha avó Ereny Rodrigues dos Reis, a vó Nica (*in memoriam*). E a todas as outras milhões de pessoas que lutam contra um câncer.

AGRADECIMENTOS

Como todo pós-graduando, nos últimos anos experimentei os sabores e dissabores da vida acadêmica. Alguns foram mais satisfatórios do que os outros; alguns foram mais difíceis do que os outros. Também não foi nada fácil escrever em meio a uma pandemia mundial devastadora, em todos os sentidos. E eu só estou aqui hoje, graças a muitas pessoas maravilhosas que me ajudaram a enfrentar os dissabores e compartilham muitos sabores comigo.

Agradeço primeiramente o meu orientador Edvaldo, um dos seres humanos mais humanos que já conheci. Obrigada por me receber de braços abertos, e por acreditar em mim desde o dia em que nos conhecemos e até quando nem eu mesma acreditava. Foram muitas vezes, e você me levantou em todas elas com seus conselhos. Muito obrigada pelos inúmeros ensinamentos e inúmeras oportunidades que me fizeram crescer como cientista.

À minha orientadora Caro, *cara mia*. Obrigada por aceitar ser minha orientadora com o trem já em curso. Você assumiu a viagem e foi endireitando o trajeto, trilho por trilho. Você limpou meus óculos embaçados, diariamente. Obrigada por me mostrar o caminho da resposta que eu não encontrava, da lacuna que eu não sabia preencher. Obrigada pela disponibilidade e consideração de sempre, que às vezes me deixavam até sem graça. Como naquele longo dia de trabalho, que você se esqueceu que tínhamos marcado de discutir meus perrengues da semana e foi embora. Quando se lembrou, largou a janta esfriando e voltou pro laboratório conversar comigo. Você é rara!

Caro e Edvaldo, vocês foram a farinha e o fermento do meu bolo. E eu estou muito orgulhosa de como ele cresceu. Um último e muito importante agradecimento a vocês dois: muito obrigada pela paciência!

Fernanda, você foi o açúcar e a baunilha desse bolo. Com muita doçura, técnica e charme na eloquência do “bioquimiquês”, foi minha orientadora também. Foi minha amiga, parceira, meu anjo defensor das broncas da Caro. Não há tonelada de cranberry que retribua a minha gratidão, principalmente nessa reta final.

Célia, você foi a cobertura e o confete colorido desse bolo. Divertida, fraterna, entusiasta, dedicada, forte! Você é o tipo de pessoa que emana boas vibrações, dá pra ver as ondas saindo de você! Muito obrigada por ser uma injeção de ânimo na minha veia, em cada conversa de corredor.

Caro, Célia, Edvaldo e Fernanda, eu admiro muito vocês e sou muito afortunada por tê-los na minha vida, profissional e pessoal. O orgulho de vocês perante esse trabalho me deixa muito feliz!

Ao Gustavo e à Jenifer, casal diamante viciado em Ciência, que me ajudou com várias consultorias e treinamentos experimentais, e *insights* sobre meu projeto.

Às minhas crianças todas, os millenials mais lindos e espertos do mundo. Açucena, Anderson, Aline, Jéssica, Keila, Malu, Vivi, Yasmin. Jovens brilhantes com quem eu tive o prazer de compartilhar refeições no RU, cafés com diversão, caronas. Conviver com vocês deixava meu dia mais leve.

De novo às minhas meninas, Açucena e Jessica. Eu tive muita sorte de ter alunas como vocês. Tenho certeza que aprendi muito mais do que orientei. E me diverti muito também, suas fofoqueiras. Obrigada pelos olhos atentos, por confiarem em mim, por todos os “porque isso”; “porque aquilo”; “ah, agora entendi!”. Por todas as vezes que você, Açucena, percebendo que eu ia ficar até altas horas da noite no laboratório, já saía arrumando as bagunças que eu deixava para trás; ou o LCIN, no meu dia na escala de limpeza, sem eu pedir. Você também, Jéssica, por todas as vezes que eu chegava atrasada pra usar o fluxo e você, por iniciativa própria, já o tinha limpo, e colocado meu meio de cultivo no banho-maria. E ficava ali do meu ladinho durante todo o processo, sendo grandes extensões dos meus braços.

A todos que fazem ou já fizeram parte do grupo LIPS/LCIN, por me proporcionarem um ambiente de harmonia e união, uma bela comprovação do ditado “várias cabeças sempre pensam melhor que uma”: Ana Helena, Camila Laís, Daniel, Gabriel, João Luis, Odair, Sabrina, Stellee, Victoria.

Às vizinhas de laboratório Antonielle e Hanna, por sempre me acolherem tão bem quando eu precisava usar o termociclador. Mas foi nas conversas de corredor que nos tornamos amigas e sobre isso eu só tenho a dizer, ainda bem!

Às vizinhas de departamento, Alessandra, Isabel e Sabrina, pelo apoio desde o mestrado. Ale, minha orientadora no mestrado, hoje minha amiga mais que especial.

À Taynah, minha amiga querida, parceira de ideais sociais, conselheira, companheira de intercamp, que fazia as viagens 40 min passarem como se fossem 5 min.

À professora Andrea Senff Ribeiro, pela simpatia com que sempre me tratou, e pelas zelosas e construtivas avaliações dos meus relatórios. Fiquei muito contente quando soube que tinha aceitado nosso convite para participar da banca de defesa também, obrigada!

Aos professores Francisco Filipak Neto, Guilhermina Noletto e Luciane Cavalli, por disponibilizarem seu tempo para ler este trabalho e nos ajudarem a enriquecê-lo ainda mais!

Ao professor Roger Chammas, pela doação das linhagens celulares utilizadas neste trabalho e por me receber em seu laboratório para o treinamento.

À professora Lucélia, por disponibilizar os equipamentos do seu laboratório, pelas risadas e abraços matinais acolhedores.

À professora Karin Braun, pelo trato gentil de sempre, por disponibilizar o citômetro de fluxo do seu laboratório, por me ceder um anticorpo fundamental na reta final, pela atenção e todos os conselhos dados como banca avaliadora do meu último relatório.

Ao professor Silvio Sanches Veiga, por disponibilizar os equipamentos do seu laboratório e pelos empréstimos de materiais e reagentes.

Aos amigos do CTAF-UFPR, Israel e Liz, pela aquisição das imagens com microscopia de fluorescência.

Ao CNPq e à CAPES pelo financiamento do projeto e pela bolsa de Doutorado.

À Alexandra Elbakyan pela grande ajuda na pesquisa bibliográfica.

Aos muitos amigos antigos que entenderam minha ausência e não desistiram de mim. Em especial a Ana, Anna Paula, Pedro, Raoni e Vivian. E à Alice, minha irmã italiana, que surpreendentemente sempre me manda uns "oi, tudo bem?" em dias não tão bons.

Aos meus irmãos Mateus e Daniel, pura e simplesmente pelo fato de existirem na minha vida. A nossa cumplicidade me conforta todos os dias. Aos meus sobrinhos Matias e Sara, por serem fontes de alegria instantânea e inesgotável.

Aos meus pais Cristina e Marcos, por respeitarem minhas escolhas e me apoiarem, mesmo com esse custo gigante da distância. Por me proporcionarem praticamente tudo para que hoje eu esteja aqui. Fazer vocês se orgulharem de mim sempre foi meu principal objetivo de vida.

Ao meu amor Giorgio, que inocentemente aceitou juntar os trapos na minha primeira semana de doutorado e não só suportou meus estresses durante esses anos, mas também cuidou de mim. Me apoiando, conversando comigo, me dando muito carinho e chocolates! Me divertindo quando eu estava triste, me erguendo quando eu estava fraca, ficando feliz quando eu estava rindo. Que sempre me entendeu, me esperava com jantinha pronta e nunca me cobrava os muitos finais de semana que passava trabalhando.

*"Para contarte, canto
Quiero que sepas
cuánto me haces bien, me haces bien
Te quiero de mil modos, te quiero sobre todo
Me haces bien
Basta ver el reflejo de tus ojos en los míos
Como se lleva el frío
Para entender
Que el corazón no miente
Que afortunadamente
Me haces bien"
Jorge Drexler.*

*“A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos,
ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos
e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe,
jamais alcançarei.
Para que serve a utopia?
Serve para isso:
para que eu não deixe de caminhar.”*

Eduardo Galeano

RESUMO

O melanoma é o tipo de câncer de pele que se origina nos melanócitos, tendo como principais fatores de risco a exposição à radiação UV e características hereditárias, como pele clara, presença de nevos (pintas) e histórico de melanoma na família. De acordo com as mutações mais frequentes, é classificado em quatro subtipos, *BRAF*-mutante, *NRAS*-mutante, *NF1*-mutante e triplo-selvagem. Os tratamentos atualmente disponíveis para os estágios avançados da doença, como a imunoterapia, a terapia alvo, ainda que tenham elevado a sobrevida dos pacientes, induzem a resistência e recorrência do tumor e assim como a quimioterapia causam efeitos colaterais deletérios que comprometem a qualidade de vida dos pacientes. Assim, se faz necessária a busca por novos compostos terapêuticos que possam não apenas aumentar a taxa de sobrevida dos pacientes em estágios avançados, mas também apresentar menor toxicidade aos mesmos. Evidências da literatura e de dados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa destacam os polissacarídeos extraídos de fontes naturais como compostos com promissoras atividades antitumorais em concentrações não citotóxicas. No presente estudo foram investigados dois polissacarídeos sulfatados ricos em fucose, extraídos da alga marrom *Spatoglossum schröderi*: a Fucana A (21 kDa); e a Fucana C (24 kDa). Como modelo biológico foram utilizadas células humanas das linhagens de melanoma A375 (*BRAF*-mutante), SKMEL-147 (*NRAS*-mutante), CHL-1 (triplo-selvagem); a linhagem de monócitos THP-1; e a linhagem de melanócitos NGM. Análises de viabilidade celular após tratamento de até 72h demonstraram que ambas as Fucanas não causaram citotoxicidade em nenhuma das linhagens e concentrações testadas (1, 10 e 100 µg/mL). Análises de morfologia, densidade e ciclo celular após 72h demonstraram que o tratamento com Fucana causou efeito citostático na linhagem triplo-selvagem CHL-1, com aumento do tempo de dobramento de 31h no controle (veículo) para 50h no grupo tratado. Esse efeito não causou morte celular, mas foi comparável quantitativamente ao do quimioterápico Cisplatina, diminuindo a densidade celular em 55%. Considerando as mutações nos genes *CDKN2A* e *TP53*, presentes na linhagem CHL-1, a Fucana A se torna um interessante candidato para terapia direcionada em casos de tumores com mutações em genes supressores de tumor. Soma-se a isso o fato de a mutação em *CDKN2A* ser muito frequente no melanoma, e a mutação em *TP53* ser a mais frequente entre todos os tipos de câncer. Além disso, nessa mesma linhagem, a Fucana A inibiu o comportamento denominado mimetismo vasculogênico, característico de células agressivas que apresentam fenótipo de célula endotelial e assim são capazes de formar redes pseudo-vasculares. A seguir análises por RT-qPCR e imunofluorescência confocal evidenciaram diminuição da expressão gênica da proteína β -catenina, que desempenha papel protagonista em diversas vias de sinalização relacionadas a melanogênese e progressão tumoral. Nas linhagens metastáticas A375 e SKMEL-147 o tratamento com os polissacarídeos reduziu o número de células invasivas e sua capacidade migratória. Em conjunto esses dados evidenciam, de forma inédita, que os polissacarídeos sulfatados ricos em fucose Fucana A e C são capazes de modular importantes fenótipos tumorais de células humanas de melanoma, com diferentes fenótipos, relacionados à classificação genômica.

Palavras-chave: Antitumoral. Melanoma triplo-selvagem. Polissacarídeo sulfatado. Fucana A. *Spatoglossum schröderi*.

ABSTRACT

Melanoma is the type of skin cancer that originates in melanocytes, having as main risk factors exposure to UV radiation and hereditary characteristics, such as fair skin, presence of nevi (spots) and family history of melanoma. According to the most frequent mutations, it is classified into four subtypes, *BRAF*-mutant, *NRAS*-mutant, *NF1*-mutant and triple wild-type. The treatments currently available for advanced stages, such as immunotherapy and target therapy, despite increasing survival rates, induce tumor resistance and recurrence and, like chemotherapy, cause deleterious side effects that compromise patients' life quality. Therefore, it is necessary to search for new therapeutic compounds that not only increase survival rate in advanced stages, but also do not cause toxicity. Evidence from the literature and previous data obtained by our research group highlights polysaccharides extracted from natural sources as compounds with promising anti-tumor activities in non-cytotoxic concentrations. In the present study, two fucose-rich sulfated polysaccharides extracted from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* were investigated: Fucan A (21 kDa); and Fucan C (24 kDa). As biological models were used human cells from melanoma lineages A375 (*BRAF*-mutant), SKMEL-147 (*NRAS*-mutant), CHL-1 (triple-wild); THP-1 monocyte lineage; and NGM melanocyte lineage. Cell viability analyzes after treatment of up to 72 hours demonstrated that both Fucans did not cause cytotoxicity in any of the cell lines and concentrations tested (1, 10 and 100 µg / mL). Morphology, density and cell cycle analysis after 72h showed that treatment with Fucan A caused cytostatic effect in the triple wild-type cell line CHL-1, with an increase in doubling time from 31h in the control (vehicle) to 50h in the treated group. This effect did not cause cell death, but it was quantitatively comparable to that of the chemotherapy drug Cisplatin, decreasing cell density by 55%. Considering the mutations in the *CDKN2A* and *TP53* genes, present in the CHL-1 cell line, Fucan A becomes an interesting candidate for targeted therapy in tumors that present mutations in tumor suppressor genes. In addition, *CDKN2A* mutation is very common in melanoma, and *TP53* mutation is the most frequent mutation among all types of cancer. In this same cell line, Fucan A inhibited the behavior called vasculogenic mimicry, characteristic of aggressive cells that present endothelial phenotype and are thus capable of forming pseudo-vascular networks. Subsequent investigations through RT-qPCR and confocal immunofluorescence analysis showed a decrease in the gene expression of β -catenin protein, which plays a protagonist role in several signaling pathways related to melanogenesis and tumor progression. In metastatic cell lines A375 and SKMEL-147, treatment with polysaccharides reduced the number of invasive cells and their migratory capacity. Together, these data show, in an unprecedented, that the fucose-rich sulfated polysaccharides Fucan A and C are capable of modulating critical tumor phenotypes of human melanoma tumor cells of distinct genomic subtypes.

Keywords: Antitumoral. Melanoma tripló wild-type. sulfated polysaccharide. Fucan A. *Spatoglossum schröderi*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA MELANOGÊNESE.....	22
FIGURA 2. ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA.....	23
FIGURA 3. MARCOS DO ESTUDO DAS MUTAÇÕES PRESENTES NO MELANOMA E PRINCIPAIS TRATAMENTOS.....	25
FIGURA 4. O POLISSACARÍDEO SULFATADO RICO EM FUCOSE DA ALGA <i>F. Vesiculosus</i> E SEUS PRODUTOS COMERCIALIZADOS.....	30
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO FUCANA A.....	31
FIGURA 6. INFOGRÁFICO DO ESTUDO.....	33
FIGURA 7. ANÁLISE DA AMOSTRA DA FUCANA A UTILIZADA NOS ENSAIOS.....	43
FIGURA 8. VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AO POLISSACARÍDEO FUCANA A.....	47
FIGURA 9. ANÁLISE DE VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR DA LINHAGEM CHL-1 APÓS EXPOSIÇÃO À FUCANA A.....	48
FIGURA 10. VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AO POLISSACARÍDEO FUCANA C.....	49
FIGURA 11. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR DE CÉLULAS DA LINHAGEM CHL-1 APÓS EXPOSIÇÃO À FUCANA A.....	50
FIGURA 12. ANÁLISE DE CICLO CELULAR DAS LINHAGENS A375 E CHL-1 APÓS EXPOSIÇÃO À FUCANA A.....	52
FIGURA 13. EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO DE FUCANA A E CISPLATINA NA VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS A375 E CHL-1.....	54
FIGURA 14. EFEITO DA PRESENÇA DA FUCANA A NA FORMAÇÃO DE REDES VASCULARES EM CÉLULAS DA LINHAGEM CHL-1.....	57
FIGURA 15. INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA CONSTRUÍDA A PARTIR DOS RESPECTIVOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA LINHAGEM CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A.....	61
FIGURA 16. DETECÇÃO DE β -CATENINA E Ki-67 EM CÉLULAS DA LINHAGEM CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A.....	65
FIGURA 17. EFEITO DA PRESENÇA DA FUCANA A NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS LINHAGENS A375 E CHL-1 DESENCADEADA VIA CD44.....	68
FIGURA 18. RASTREAMENTO DA FUCANA A NA LINHAGEM A375.....	70
FIGURA 19. RASTREAMENTO DA FUCANA A NA LINHAGEM CHL-1.....	71
FIGURA 20. EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA CAPACIDADE INVASIVA DAS LINHAGENS A375 E SKMEL-147.....	73
FIGURA 21. EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM SKMEL-A375.....	74
FIGURA 22. EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM SKMEL-147.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ATIVIDADES ANTITUMORAIS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS RICOS EM FUCOSE.....	27
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS LINHAGENS CELULARES HUMANAS UTILIZADAS COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	35
TABELA 3 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA LINHAGEM CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA.....	18
1.2 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 O MELANOMA.....	19
2.1.1 CLASSIFICAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E GENÉTICAS DO MELANOMA.....	20
2.1.2 ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DO MELANOMA.....	22
2.2 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS RICOS EM FUCOSE COMO AGENTES ANTITUMORAIS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 OBTENÇÃO DAS FUCANAS A E C.....	33
3.2 LINHAGENS CELULARES.....	34
3.3 ANÁLISE DE VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR.....	35
3.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR NA PRESENÇA DO QUIMIOTERÁPICO CISPLATINA.....	36
3.5 ENSAIO DE CICLO CELULAR.....	37
3.6. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE VASOS COM CÉLULAS DE MELANOMA (MIMETISMO VASCULOGÊNICO).....	37
3.7 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	38
3.8 ANÁLISE DE DENSIDADE CELULAR NA PRESENÇA DO ANTICORPO ANTI-CD44: ENSAIO DE COMPETIÇÃO.....	39
3.9 CONJUGAÇÃO FUCANA A COM O FLUORÓFORO DTAF.....	39
3.10 ANÁLISES POR MICROSCOPIA DE VARREDURA A LASER CONFOCAL.....	40
3.10.1 ANÁLISES DE MORFOLOGIA E DETECÇÃO DE PROTEÍNAS β -CATENINA E Ki-67.....	40
3.10.2 ANÁLISE DE LOCALIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA FUCANA A.....	40
3.11 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR.....	41
3.12 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	41

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DOS POLISSACARÍDEOS.....	42
4.2 ANÁLISE DE VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS DE CÉLULAS DE MELANOMA COM DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES.....	44
4.2.1 ANÁLISE DE MORFOLOGIA CELULAR DA LINHAGEM CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A.....	50
4.2.2 ANÁLISE DE CICLO CELULAR DA CHL1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A.....	51
4.2.3 ANÁLISE DO EFEITO CITOSTÁTICO DA FUCANA A EM TRATAMENTO COMBINADO COM UM COMPOSTO QUIMIOTERÁPICO.....	52
4.2.4 ANÁLISE DO MIMETISMO VASCULOGÊNICO EM CÉLULAS DA LINHAGEM CHL-1 EXPOSTAS À FUCANA A.....	54
4.2.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO E MATRIZ EXTRACELULAR.....	58
4.2.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE B-CATENINA E KI-67.....	62
4.2.7 ANÁLISE DE INTERAÇÃO FUCANA A - CD44.....	66
4.2.8 LOCALIZAÇÃO DA LIGAÇÃO DA FUCANA A.....	68
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE FENÓTIPOS TUMORAIS RELACIONADOS À METÁSTASE.....	72
5 CONCLUSÕES	76
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO 1 DADOS RT-qPCR DA CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A (72h, 100 ug/mL).....	91
ANEXO 2 ANÁLISES DE ENRIQUECIMENTO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA LINHAGEM CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A (100 µg/mL, 72h).....	94

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer desafiador. Apesar dos avanços científicos, a resistência aos tratamentos é um obstáculo constante, uma vez que se trata de uma doença que apresenta alta carga mutagênica, heterogeneidade tumoral e eficientes mecanismos de resposta adaptativa (Lee *et al.*, 2017). O prognóstico é favorável nos estágios iniciais, em pacientes com lesões primárias ressecáveis, mas se torna infortúnio em estágios mais avançados, com presença de metástases. Nesses casos, os tratamentos disponíveis atualmente, com quimioterapia, terapia alvo e imunoterapia, ainda apresentam baixa efetividade e causam efeitos colaterais graves, que muitas vezes obrigam os pacientes a abandonar os tratamentos.

De uma forma geral, um agente anticâncer ideal deve ser capaz de inativar o tumor sem causar efeitos colaterais que prejudiquem a qualidade de vida do paciente. Considerando isso, nosso grupo de pesquisa se interessa por moléculas que sejam capazes de modular fenótipos tumorais sem apresentar efeitos tóxicos. Nosso foco de pesquisa são os polissacarídeos, oriundos de diferentes fontes, como as heparinas, de origem animal; os hetero e homopolissacarídeos de algas e de cogumelos; e as pectinas de fontes vegetais.

Dentre os polissacarídeos sulfatados estudados pelo nosso grupo de pesquisa, este trabalho buscou focar num grupo especial de compostos, dentre aqueles encontrados na matriz extracelular de algas marrons. São uma classe de heteropolissacarídeos geralmente denominada fucoidanas ou fucanas, devido à presença proeminente de fucose (Li *et al.*, 2017; Palanisamy *et al.*, 2017). Esses polissacarídeos foram testados em uma vasta gama de modelos experimentais, nos quais apresentaram atividades anticoagulante, antioxidante, anti-inflamatória antitumoral, antimetastática, antiangiogênica e imunomoduladora (Li *et al.*, 2017; Palanisamy *et al.*, 2017; Silchenko *et al.*, 2017).

A alga marrom *Spatoglossum schröderi*, que está vastamente presente na costa do Nordeste brasileiro, fato que a torna um conveniente objeto de bioprospecção. Análises químicas demonstraram que a Fucana A é uma xilofucoglucoronana de 21kDa, composta por fucose, xilose, ácido glucurônico e sulfato (1 : 035: 0.55 : 1.5) e que a

Fucana C (24 kDa) é uma xilogalactofucana composta por fucose, xilose, galactose e sulfato (1 : 0,6 : 2 : 2,3) (Leite *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2005). Para esses polissacarídeos já foram descritas as atividades antitrombótica (Rocha *et al.*, 2005; Barroso *et al.*, 2008; Almeida-Lima *et al.*, 2011); e antiproliferativa, em diversas linhagens tumorais (Almeida-Lima *et al.*, 2010; Dantas-Santos *et al.*, 2012; Rocha Amorim *et al.*, 2016)

Em estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa em modelo de melanoma murino, a Fucana A não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das linhagens testadas, normais e tumorais (B16F10, de melanoma; Balb/3T3, de fibroblastos e RAW 264.7, de macrófago), mas inibiu a proliferação e reduziu a capacidade invasiva da linhagem tumoral (Ferreira, 2012; Santi, 2015; Maximo, 2019). A Fucana C também não apresentou citotoxicidade para as células, mas reduziu a capacidade invasiva e migratória das células de melanoma murino (Santi, 2015). Em estudo *in vivo* a Fucana A foi testada em modelos de tumor sólido subcutâneo e de colonização/metástase pulmonar desenvolvidos com células de melanoma murino. Em tratamento terapêutico (iniciado 5 dias após a inoculação das células), foi capaz de reduzir o crescimento tumoral e a área de vasos intratumorais. Em tratamento preventivo (iniciado 2 dias antes da inoculação das células), reduziu o crescimento do tumor sólido e o número de nódulos no pulmão. A análise dos parâmetros fisiológicos, perfis hematológico e bioquímico, não mostraram alterações que indicassem toxicidade, confirmando que o polissacarídeo é seguro para uso *in vivo* (Bini, 2018).

Assim, considerando os efeitos observados para as fucanas A e C nas linhagens murinas e ainda a fácil obtenção desses polissacarídeos, por estarem presentes em fontes abundantes na natureza, também passíveis de cultivo em larga escala, cujo manejo sustentável poderia gerar renda para comunidades habitantes da vasta área litorânea brasileira, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial antitumoral dessas biomoléculas em modelo de melanoma humano *in vitro*, com linhagens representantes de diferentes subtipos moleculares. Foram realizados ensaios para a análise de possíveis efeitos das fucanas, em concentrações não tóxicas, sobre processos e moléculas chave relacionados com a malignidade tumoral.

1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando que o melanoma é um tipo de câncer para o qual os tratamentos atualmente disponíveis ainda são pouco eficientes nos casos mais avançados, com presença de metástases e, ainda, causam severos efeitos colaterais, é de extrema importância a busca por novos agentes terapêuticos, que sejam mais eficazes e menos tóxicos para os pacientes. Nesse sentido, os polissacarídeos sulfatados obtidos de fontes naturais renováveis tornam-se candidatos promissores, pelas diversas atividades biológicas já evidenciadas. Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa em modelo de melanoma murino, *in vitro* e *in vivo*, demonstraram interessantes atividades antitumorais dos polissacarídeos sulfatados ricos em fucose, Fucana A e Fucana C, extraídos da alga marrom *Spatoglossum schröderi*. Assim, o próximo passo, razão deste trabalho, é a investigação do potencial antitumoral desses polissacarídeos em modelo de melanoma humano, mais fidedigno da realidade, e com diferentes perfis de classificação genômica, abrangendo assim diferentes fenótipos da doença.

1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral dos polissacarídeos sulfatados ricos em fucose, Fucana A e Fucana C, em modelo de melanoma humano *in vitro*, utilizando linhagens com diferentes subtipos moleculares.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos polissacarídeos sulfatados ricos em fucose, Fucana A e Fucana C, para células humanas não tumorais (macrófagos e melanócitos) e de melanoma com diferentes subtipos moleculares;
- Avaliar o potencial de concentrações não citotóxicas dos polissacarídeos em reprogramar fenótipos tumorais das células de melanoma humano, como a angiogênese, a capacidade invasiva e migratória;
- Investigar como ocorre a interação molecular entre os polissacarídeos e as células de melanoma humano;
- Investigar possíveis mecanismos de ação relacionados aos efeitos observados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O MELANOMA

A pele é constituída de duas camadas principais, a epiderme e a derme, as quais juntas exercem inúmeras funções, dentre elas a de proteção, vigilância imunológica, termorregulação, excreção, sensação e produção de vitamina D (Eyerich *et al.*, 2018). A derme é composta majoritariamente de matriz extracelular, produzida pelos fibroblastos, onde a malha de colágeno, principalmente tipo I, é intercalada com fibras de elastina, fibronectina, ácido hialurônico, proteoglicanos, entre outros componentes (D’Orazio *et al.*, 2013). A epiderme é a camada mais externa da pele, funcionando, portanto, como uma barreira mecânica contra agentes externos. Essa camada é formada principalmente por queratinócitos, cuja função principal é a produção e armazenamento de queratina, a proteína fibrosa que garante à pele e aos seus apêndices o caráter hidrofóbico e de rigidez do órgão (Rosso *et al.*, 2016). No estrato basal da epiderme, entre outras células, encontram-se os melanócitos, células derivadas da crista neural e produtoras de melanina, pigmento que, ao se acumular em vesículas denominadas melanosomos, dá cor à pele, aos cabelos e pelos, e protege as células dos efeitos nocivos da radiação solar ultravioleta (UV) (Lin e Fisher, 2007).

O melanoma é o tipo de câncer de pele que se origina nos melanócitos,, fato, portanto, que o difere dos carcinomas - se originam em tecidos epiteliais - e dos sarcomas - se originam em tecidos mesenquimais (Weinberg, 2013). A designação “melanoma” foi cunhada em 1804, pelo médico francês Rene Laennec, inventor do estetoscópio, quando ainda era estudante e caracterizou as metástases pulmonares observadas em autópsias de “melanose”, uma derivação do grego *mela*, *melan*, que significa “preto” (Roguin, 2006). Seu desenvolvimento pode ser desencadeado a partir de três principais condições: fatores genéticos, presença de múltiplos nevos e exposição à radiação solar UV (Vultur e Herlyn, 2013; Berwick *et al.*, 2016). Aproximadamente 25% dos casos se originam a partir de lesões pré existentes, portanto a maioria dos tumores de melanoma são desencadeados por estímulos oncogênicos que levam à proliferação dos melanócitos mutados (Cockerell, 2012), fazendo com que essa doença tenha a maior carga mutagênica entre todos os tipos de câncer; sendo a mutação pontual denominada transição citosina/timina (predominância C>T), característica do melanoma, considerada

uma forte assinatura das mutações decorrentes da radiação UV. (Alexandrov *et al.*, 2013).

2.1.1 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E GENÔMICA DO MELANOMA

O subtipo mais comum de melanoma (90% dos casos) é o cutâneo, mas a doença também pode se desenvolver em outros tecidos onde residem os melanócitos, caracterizando os subtipos uveal (ocular) e o de mucosas (genitais, cavidades oral, anal e nasal) (Elder *et al.*, 2020). Os melanomas cutâneos por sua vez podem ser classificados de acordo com parâmetros como o perfil histopatológico, o grau de exposição aos raios UV, e o perfil das mutações promotoras. Esses parâmetros, por sua vez, podem se interrelacionar.

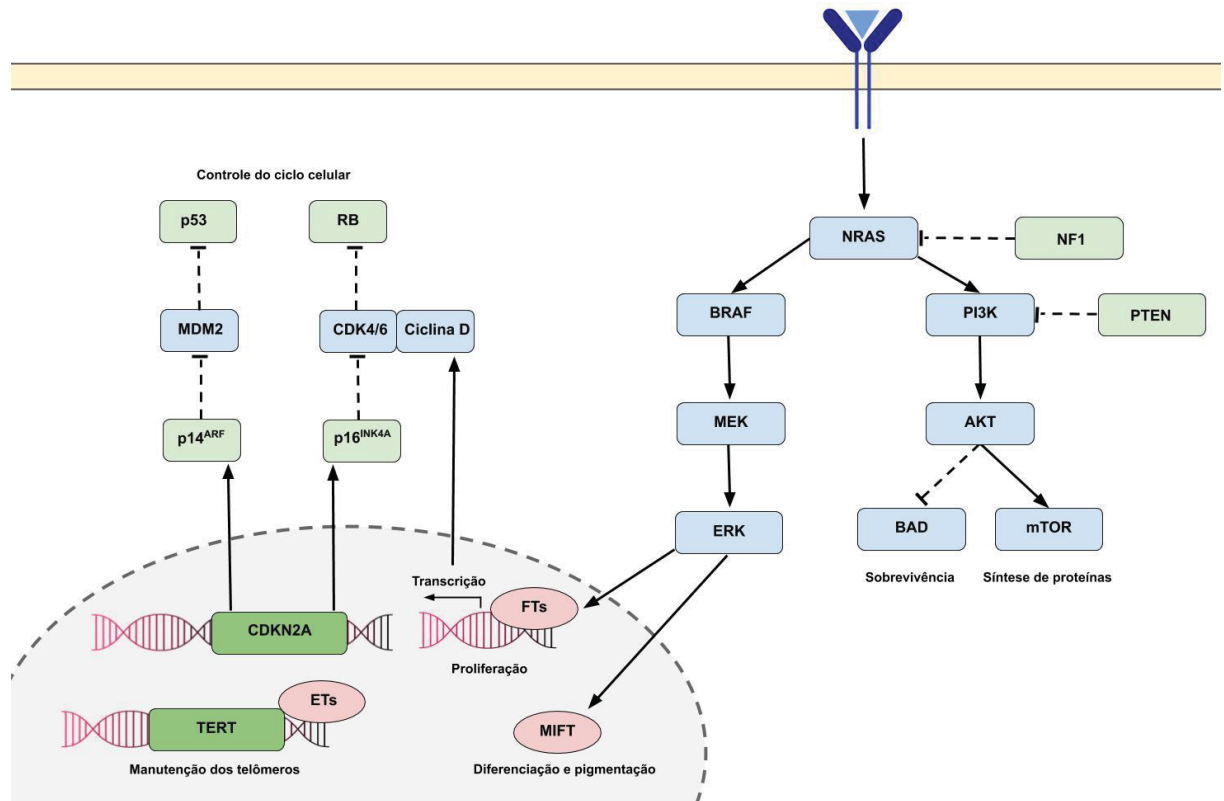
Histopatologicamente o melanoma cutâneo é dividido em quatro tipos principais: o lentigo maligno, o extensivo superficial, o nodular e o acral. O lentigo maligno costuma se desenvolver na face e nos braços de idosos, expostos à radiação UV durante toda a vida. O extensivo superficial é o mais comum entre caucasianos; em pessoas mais jovens com lesões pré existentes. A ocorrência do melanoma tipo acral varia bastante entre as etnias, sendo mais frequente em asiáticos e afro descendentes e se desenvolve na palma das mãos e sola dos pés. O nodular é o mais perigoso dos subtipos, devido a sua maior capacidade de crescer verticalmente, invadindo a derme (Kim e Yun, 2016; Rapisuwon *et al.*, 2020). No estudo de revisão de Shain e Bastian o melanoma cutâneo foi dividido em dois grupos, de acordo com o fator exposição solar. Segundo o estudo, melanomas decorrentes de danos devido à exposição ao sol (CSD, do inglês *chronically sun-damaged*) são caracterizados por maior acúmulo de mutações, por se desenvolverem em áreas do corpo mais expostas ao sol e em pacientes idosos. Já os melanomas não relacionados à radiação solar (*nonCSD*) são caracterizados por menor número de mutações, por se desenvolverem em pessoas mais jovens e com nevos pré existentes (Shain e Bastian, 2016).

De acordo com o perfil de mutações mais frequentes no melanoma, o trabalho que é considerado um marco na descrição das aberrações somáticas responsáveis pelo desenvolvimento da doença é o estudo de 2015 de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Nele foram realizadas análises de sequenciamento, não só do DNA (WES, do inglês *whole-exome sequencing*), mas também de mRNA e miRNA, e expressão de proteínas em 333 amostras de melanoma (de tumores cutâneos primários e/ou metastáticos).

Foram encontradas 3 mutações entre as mais frequentes, estabelecendo-se a classificação genômica do melanoma em 4 subtipos, *BRAF*-mutante, *RAS*-mutante, *NF1*-mutante e triplo-selvagem (TCGA, 2015).

Posteriormente outras análises de sequenciamento de amostras de melanoma foram publicadas. No estudo de Hayward e colaboradores (Hayward *et al.*, 2017) foram analisadas (por *WES*) 183 amostras, de tumores primários, metástases e linhagens celulares, onde as mutações majoritárias foram nos genes *BRAF*, *CDKN2A*, *NRAS* e *TP53*. Nas amostras de tumores acrais as mutações mais comuns foram em *BRAF*, *NRAS* e *NF1*. No estudo de Garman e colaboradores (2017) foram feitas análises de sequenciamento de 108 genes previamente implicados na melanogênese, em 462 amostras, compreendendo linhagens celulares, tumores e xenotransplantes derivados de pacientes (PDX, do inglês *patient-derived xenografts*). Nesse total de amostras a mutação em *BRAF* foi encontrada em 55%; *NRAS* em 19%; *NF1* em 6%; e 20% não apresentaram nenhuma das 3 mutações (triplo-selvagem). Levando-se em conta exclusivamente as amostras de tumores, a porcentagem de amostras triplo-selvagem foi ainda maior, de 32% (*BRAF* de 49%; *NRAS* de 14%; *NF1* de 5%). Nas linhagens celulares a mutação em *CDKN2A* foi mais frequente (75%) do que em tumores (24%) e xenotransplantes (52%). Porém, vale ressaltar que a mutação em *CDKN2A* ocorre em aproximadamente 40% dos melanomas de pacientes com histórico na família (Read, Wadt e Hayward, 2016). Já no estudo de Shain e colaboradores (Shain *et al.*, 2018) foi feito um acompanhamento da progressão do melanoma, desde lesões pré-malignas a metástases regionais. Nesse estudo, que consolidou o entendimento sobre as vias de sinalização afetadas, foram sequenciados DNA e RNA de centenas de genes previamente relacionados ao melanoma, em 230 amostras retiradas de 82 pacientes, em diferentes coletas ao longo do tempo. As alterações somáticas induziram, na sequência: ativação da via MAPK, modulação positiva da telomerase, desorganização da cromatina, inativação do ponto de checagem G1/S, sustentabilidade dos sinais da via MAPK, inativação de p53 e ativação da via PI3K. A Figura 1 abaixo ilustra as principais vias de sinalização relacionadas a melanogênese, de acordo com os estudos citados.

FIGURA 1. PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA MELANOGÊNESE



Fonte: a autora

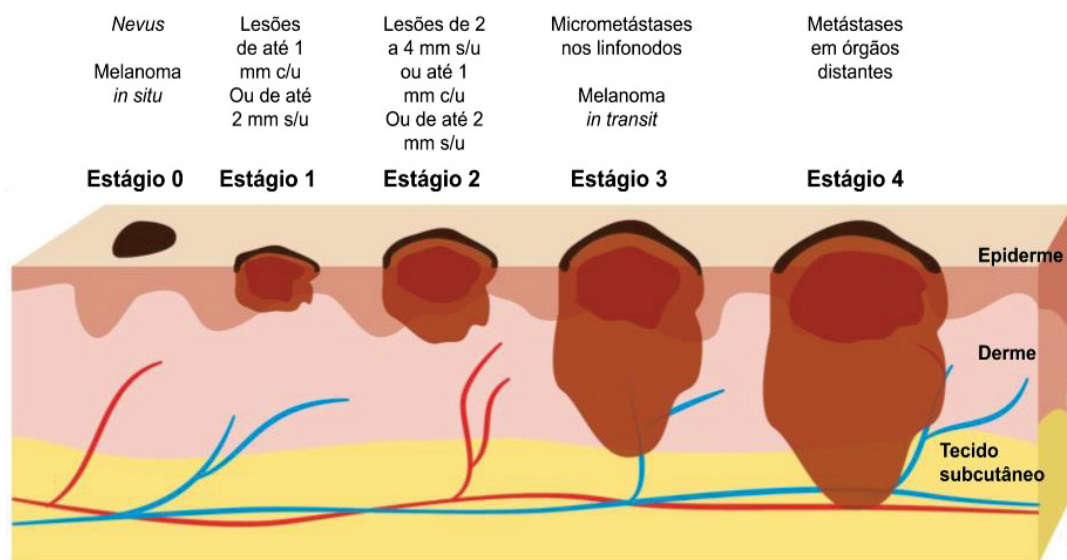
Legenda: As vias de sinalização que controlam o crescimento celular, a proliferação e a sobrevivência são desreguladas no melanoma. Alterações genéticas nos componentes das vias MAPK/ERK, PI3K/Akt, CDKN2A e p53 promovem a iniciação e progressão do melanoma.

2.1.2 ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DO MELANOMA

A classificação genômica acima descrita e o estadiamento do melanoma são imprescindíveis para a escolha do tratamento mais apropriado, e ainda podem ser úteis para a estimativa do prognóstico de sobrevivência do paciente. Atualmente o estadiamento de tumores é determinado por normas internacionais da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), baseadas no sistema TNM, que visa a análise anatômica do tumor, a partir da avaliação de três parâmetros: T - a extensão do tumor primário; N - a ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais; e M - a ausência ou presença de metástases em órgão distantes (Figura 2). A adição de números a esses três parâmetros indica o grau de progressão do tumor (Edge e Compton, 2010). As normas para o estadiamento do melanoma foram recentemente atualizadas pelo AJCC (Gershenwald e Scolyer, 2018), a partir de dados de mais de 46000 pacientes, de 10 centros de pesquisa do mundo, em estágio I, II e III, e diagnosticados desde 1998. O estágio III, caracterizado

pela presença de micrometástases nos linfonodos, antes dividido em três subgrupos, na atualização foi dividido em 4 subgrupos. No estágio IIID, último do estágio III, a análise de taxa de sobrevida pós-diagnóstico dos pacientes resultou em sobrevida de 5 anos de 32% e de 10 anos de 24%. Portanto, é de se esperar que para o estágio IV, caracterizado pela presença de metástases em órgãos distantes, o prognóstico seja ainda mais desfavorável. Segundo o último censo global realizado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC- Globocan), para o ano de 2018 foram contabilizados aproximadamente 290 mil novos casos de melanoma, e 61 mil mortes, que o representa 20% do total.

FIGURA 2. ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA



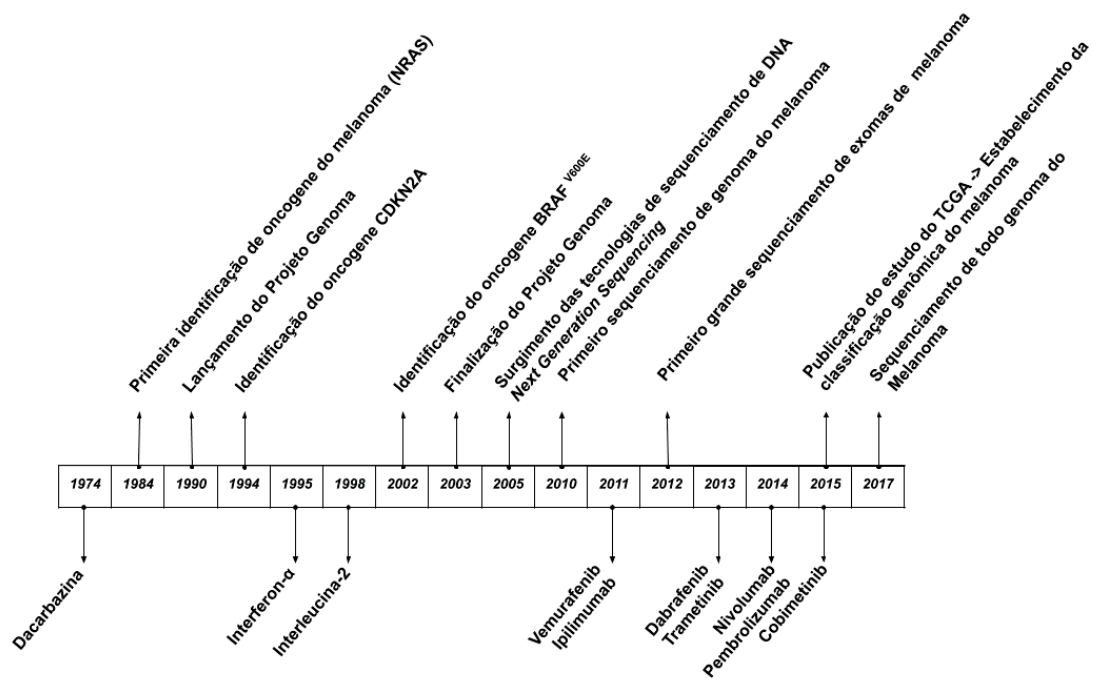
Fonte: Adaptado de (*Melanoma Awareness & Support*, no date)

Legenda: Representação esquemática do estadiamento do melanoma, de acordo com o sistema TNM. s/u = sem ulceração; c/u = com ulceração

A remoção cirúrgica é o principal tratamento para o melanoma, e o único considerado curativo (Faries e Ariyan, 2011). A excisão cirúrgica apresenta taxas de cura próximas a 100% nos estágios iniciais da doença, além de fornecer informações importantes sobre o grau de infiltração do tumor primário, pela medida da sua espessura (escala de Breslow) e presença de ulcerações (Homsí *et al.*, 2005). A biópsia do linfonodo sentinela geralmente é feita em pacientes portadores de melanomas com espessura maior que 1 mm, o que garante uma alta chance de cura a pacientes em estágio III. Nesse estágio a terapia adjuvante (pós-cirurgia) com radioterapia também é uma opção de tratamento, uma vez que diminui a chance de recidiva (Leiter *et al.*, 2016; Fioranelli *et al.*, 2017).

As metástases podem se desenvolver em qualquer órgão, porém se formam com mais frequência em linfonodos distantes; nos pulmões, ossos; no cérebro e no fígado (Shain e Bastian, 2016). O uso de agentes quimioterápicos, como dacarbazina, cisplatina, temozolomida, nitrosoureas e taxóis, foi durante décadas o tratamento de primeira escolha para o melanoma metastático irressuscável, porém a taxa de responsividade não ultrapassava os 20% (Middleton *et al.*, 2000; Yang e Chapman, 2009). A Dacarbazina, aprovada em 1974 e utilizada como agente quimioterápico preferencial para o tratamento do melanoma metastático durante décadas, apresenta taxa de resposta de 16% e expectativa de 5 anos de sobrevida de apenas 2% (Bhatia, Tykodi e Thompson, 2009). No final da década de 90 foram aprovadas duas novas drogas - as primeiras tentativas de abordagem imunoterápica - a interferon- α (IFN- α), uma citocina que ativa células NK, foi aprovada em 1995; e a interleucina-2 (IL-2), uma citocina imunoestimulatória envolvida principalmente na proliferação de linfócitos T, foi aprovada em 1998 (Atkins *et al.*, 1999; Kirkwood *et al.*, 2004). Ambas drogas apresentaram melhora na taxa de sobrevida em uma pequena porcentagem dos pacientes (5%), com responsividade de 23% para IFN- α e de 16% para IL-2. Além dessa baixa efetividade, aproximadamente 95% dos pacientes tratados com quimioterapia, IFN- α e IL-2 desenvolviam resistência (Atkins *et al.*, 2000; Tarhini, Gogas e Kirkwood, 2012). A partir do ano de 2010 foram aprovadas uma série de novas drogas antimelanoma, sendo as primeiras o Ipilimumab, um imunoterápico anti-CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), molécula que bloqueia a ação dos linfócitos T (Hodi *et al.*, 2010; Sharma e Allison, 2015); e o Vemurafenib, um inibidor da oncoproteína BRAF (BRAFi) (Chapman *et al.*, 2011). Em 2013 um novo inibidor de BRAF, Dabrafenib (Ballantyne e Garnock-Jones, 2013); e um inibidor de MEK (MEKi), Trametinib, foram aprovados (Ballantyne e Garnock-Jones, 2013; Wright e McCormack, 2013). A seguir foram aprovados os anticorpos anti-PD-1 Nivolumab e Pembrolizumab (Okazaki e Honjo, 2007; Poole, 2014; Ascierto *et al.*, 2016; Beaver *et al.*, 2017); e mais um MEKi, Cobimetinib (Garnock-Jones, 2015). A Figura 3 abaixo resume a cronologia dos principais marcos no estudo das mutações do melanoma; e da aprovação de novos tratamentos.

FIGURA 3. MARCOS DO ESTUDO DAS MUTAÇÕES PRESENTES NO MELANOMA E PRINCIPAIS TRATAMENTOS



Fonte: a autora

Legenda: Linha cronológica dos estudos de genômica que possibilitaram a identificação das mutações do melanoma; e da aprovação de agentes antimelanoma.

Estudos randomizados de fase 3 com os inibidores de BRAF Vemurafenib e Dabrafenibe vs. Dacarbazina mostraram taxas de resposta de 50 a 53% em pacientes com melanoma metastático *BRAF*-mutante (Hauschild *et al.*, 2012). Porém, novamente, apesar do aumento da taxa de resposta, a maioria dos pacientes desenvolve resistência, intrínseca ou adquirida, à terapia alvo com inibidores de BRAF, levando à reativação da via MAPK ou à ativação da via PI3K/AKT/mTOR (Long *et al.*, 2015);

Uma análise de 1861 pacientes tratados com Ipilimumab, em 12 ensaios clínicos demonstrou 20% de taxa de sobrevida de 3 anos (Schadendorf *et al.*, 2015). O tratamento combinado Ipilimumab/Nivolumab aumenta a taxa de sobrevida, sendo a abordagem terapêutica preferida atualmente (Jenkins e Fisher, 2020), porém mais de 50% dos pacientes apresentam efeitos colaterais tão graves que impedem a sua continuidade (De Velasco *et al.*, 2017). Além disso, também foi observada resistência ao tratamento com imunoterapia, muito provavelmente devido à dificuldade de detecção das células tumorais pelos linfócitos T (Sharma *et al.*, 2017; Gide *et al.*, 2018). Para pacientes incapazes de tolerar a imunoterapia sistêmica, o tratamento sugerido é o combinado de

terapia alvo BRAFi/MEKi (Jenkins e Fisher, 2020). As melhores taxas de resposta, acima de 70%, foram obtidas nos tratamentos combinados anti-PDL-1/BRAFi/MEKi, acompanhadas, porém, de expressiva toxicidade (Ascierto *et al.*, 2019; Ribas *et al.*, 2019; Sullivan *et al.*, 2019).

Assim, os tratamentos atualmente disponíveis: quimioterapia, imunoterápicos e terapias alvo com foco na via MAPK, ainda apresentam taxas de resposta insatisfatórias, graves efeitos colaterais, somados ainda à extraordinária capacidade do melanoma de desenvolver resistência (Reuben *et al.*, 2017).

Na busca por novas opções de tratamentos, existem atualmente 3 estudos clínicos em andamento no Brasil, registrados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), com foco na ação de imunoterápicos e terapias alvo, sendo que apenas um deles o critério de inclusão contempla pacientes *BRAF*-selvagem (*Estudos clínicos com inscrições abertas no INCA*, 2018). Já na base de dados *ClinicalTrials.gov* do *National Institute of Health* (NIH) a busca por “melanoma” resultou em 2511 estudos clínicos totais, sendo apenas 36 relacionados a melanomas *BRAF*-selvagem e nenhum deles com foco no grupo triplo-selvagem (*Home - ClinicalTrials.gov*, no date a).

Assim, verifica-se que a pesquisa de novos tratamentos ainda se concentra na mutação mais frequente no melanoma, em *BRAF*, negligenciando a classe triplo-negativa, que não pode se beneficiar dos tratamentos já aprovados. Além disso, vale salientar que no Brasil o quimioterápico Dacarbazina, apesar da baixa responsividade, por motivos econômicos ainda é a única opção de tratamento disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde brasileiro (Corrêa *et al.*, 2019). Nesse contexto é necessária a busca por agentes antimelanoma com custos de produção mais baixos, que sejam mais efetivos e não causem efeitos colaterais que prejudiquem a qualidade de vida dos pacientes.

2.2 POLISSACARÍDEOS RICOS EM FUCOSE COMO AGENTES ANTITUMORAIS

A pesquisa oncológica sempre pode contar com substâncias naturais como promissoras candidatas promissoras para as terapias antitumorais. De fato, aproximadamente 65% dos agentes antitumorais aprovados nos últimos 40 anos são oriundos de fontes naturais, ou de sínteses baseadas em compostos naturais (Newman e Cragg, 2020). Entre os compostos naturais, os polímeros produzidos por organismos marinhos são de especial interesse, devido às suas similaridades biológicas e químicas

com composições teciduais de outros organismos (Oliveira *et al.*, 2017), fato que garante afinidade biológica e baixa toxicidade.

Polissacarídeos sulfatados presentes na matriz extracelular de algas marrons são uma classe de heteropolímeros geralmente denominada fucoidanas ou fucanas, devido à presença proeminente de fucose (Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). Para enfatizar a importância destes compostos naturais, vale ressaltar que as fucanas e galactanas sulfatadas oriundas de algas marinhas, são os polissacarídeos sulfatados mais bem estudados, depois de alguns de origem de mamíferos (Pomin e Mourão, 2008). Esses polissacarídeos foram testados em uma vasta gama de modelos experimentais, nos quais foram evidenciadas diversas atividades antitumorais (Tabela 1). Já na base de dados *ClinicalTrials.gov* do *National Institute of Health* (NIH) a busca pelo termo “fucan” não retornou nenhum resultado; e a busca pelo termo “fucoidan” resultou em 9 estudos clínicos. Dois estão em fase de recrutamento, sendo um com objetivo de pesquisar a atividade antitumoral em carcinoma hepatocelular (*Study of Oligo-Fucoidan in Advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC) - Full Text View - ClinicalTrials.gov*, no date) e o outro com objetivo de pesquisa do efeito auxiliar do polissacarídeo, na melhora da qualidade de vida dos pacientes com câncer retal (*The Auxiliary Effects of Fucoidan for Locally Advanced Rectal Cancer Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov*, no date).

TABELA 1. ATIVIDADES ANTITUMORAIS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS RICOS EM FUCOSE

Alga	Tipo de câncer	Atividade	Modelo	Referência
<i>Fucus vesiculosus</i>	Leucemia	↓proliferação X ciclo celular ↑apoptose	<i>In vitro</i>	(Jin <i>et al.</i> , 2010; H. S. Park <i>et al.</i> , 2013; Atashrazm <i>et al.</i> , 2016)
	Linfoma	↓proliferação X ciclo celular ↑apoptose	<i>In vitro e in vivo</i>	(Aisa <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 2015)
	Estômago	↑apoptose ↑autofagia	<i>In vitro</i>	(Park <i>et al.</i> , 2011)
	Colorretal	↓proliferação ↓colônias X ciclo celular ↑apoptose ↓angiogênese ↓metastase	<i>In vitro e in vivo</i>	(Hyun <i>et al.</i> , 2009; Kim <i>et al.</i> , 2010; Chen <i>et al.</i> , 2014; Han, Lee e Lee, 2015; Vishchuk <i>et al.</i> , 2016; Park <i>et al.</i> , 2017)

	Bexiga	X ciclo celular ↓pRb	<i>In vitro</i>	(Park <i>et al.</i> , 2015)
	Ovário	↓proliferação X ciclo celular	<i>In vitro</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
	Mama	↓proliferação ↓colônias X ciclo celular ↑apoptose ↓metástase		(Zhang, 2011; Banafa <i>et al.</i> , 2013; Chen <i>et al.</i> , 2014; Kasai <i>et al.</i> , 2015; Zhang <i>et al.</i> , 2016)
	Melanoma	↓proliferação ↑apoptose	<i>In vitro</i>	(Ale <i>et al.</i> , 2011)
	Útero	↓proliferação ↑apoptose	<i>In vitro</i>	(Kasai <i>et al.</i> , 2015; Zhang <i>et al.</i> , 2016; Zhurishkina <i>et al.</i> , 2017)
	Pulmão	↓proliferação ↑apoptose ↓migração ↓invasão ↓metástase	<i>In vitro e in vivo</i>	(Alekseyenko <i>et al.</i> , 2007; Ale <i>et al.</i> , 2011; Lee, Kim e Kim, 2012; Hsu <i>et al.</i> , 2014, 2017; Huang <i>et al.</i> , 2015; Oliveira <i>et al.</i> , 2017)
	Fígado	↓proliferação ↑apoptose	<i>In vitro</i>	(Min <i>et al.</i> , 2014; Zhurishkina <i>et al.</i> , 2017)
	Osteosarcoma	↓proliferação ↑apoptose ↓angiogênese	<i>In vitro</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2016; Wang <i>et al.</i> , 2017)
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	Linfoma	↓proliferação ↑apoptose ↓metástase	<i>In vitro e in vivo</i>	(Haneji <i>et al.</i> , 2005; Ishikawa e Mori, 2017)
	Estômago	↓proliferação X ciclo celular	<i>In vitro</i>	(Hayakawa <i>et al.</i> , 2011)
	Útero	↓metástase	<i>In vitro</i>	(Ye <i>et al.</i> , 2005)
	Rim, útero, ovário e fígado	↓proliferação X ciclo celular ↑apoptose ↓metástase	<i>In vitro e in vivo</i>	(Fukahori <i>et al.</i> , 2008)
<i>Sargassum</i> sp.	Pulmão	↓proliferação X ciclo celular ↑apoptose ↓metástase	<i>In vitro e in vivo</i>	(Ale <i>et al.</i> , 2011; H. Chen <i>et al.</i> , 2016; Hsu <i>et al.</i> , 2017; Hwang, Sung e Liaw, 2019)
	Melanoma	↓proliferação ↑apoptose	<i>In vitro</i>	(Ale <i>et al.</i> , 2011)
	Fígado	↓proliferação	<i>In vitro</i>	(Yan <i>et al.</i> , 2015)

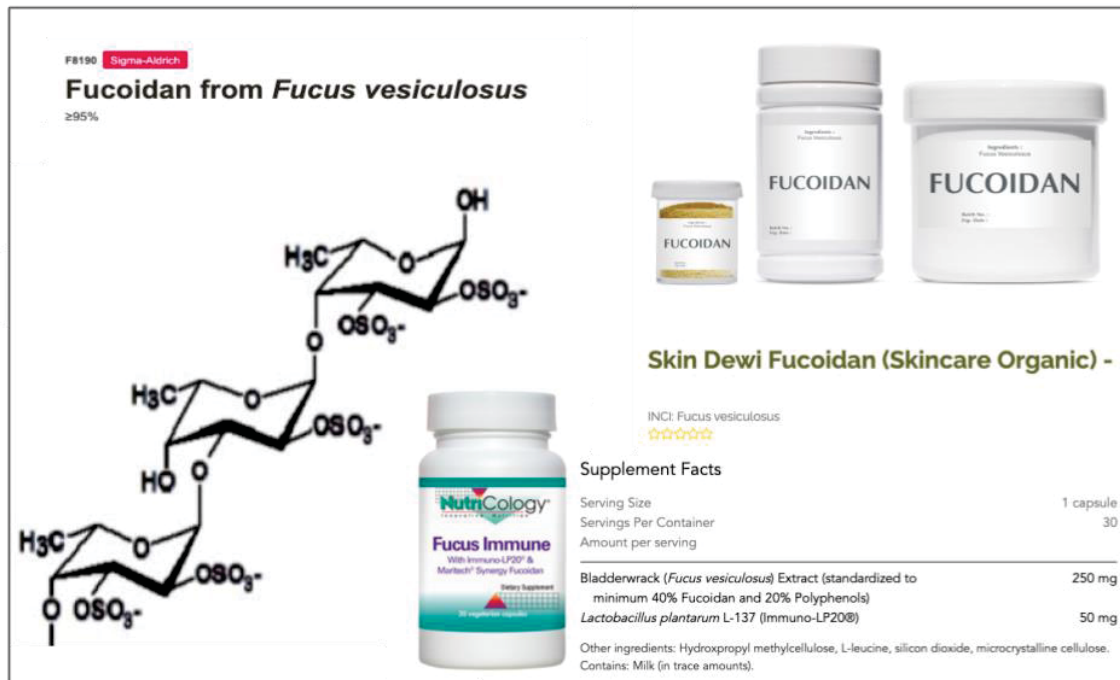
		↓metástase		
<i>Spatoglossum schröderi</i>	Leucemia, melanoma, pâncreas, próstata e útero	↓proliferação ↓angiogênese	<i>In vitro</i>	(Almeida-Lima <i>et al.</i> , 2010; Costa <i>et al.</i> , 2010; Rocha Amorim <i>et al.</i> , 2016; Menezes <i>et al.</i> , 2018)
<i>Turbinaria conoides</i>	Pulmão	↑apoptose	<i>In vitro</i>	(Alwarsamy, Gooneratne e Ravichandran, 2016)
	Pâncreas	↓proliferação ↑apoptose ↓metástase	<i>In vitro e ex vivo</i>	(Matsubara <i>et al.</i> , 2005; Venkatesan, Anil e Kim, 2017)

Fonte: a autora (2020)

Legenda: A Tabela acima reúne, de forma esquemática, o conjunto de informações sobre “o estado da arte” das atividades biológicas de polissacarídeos ricos em fucose, em modelos tumorais. ↑ = estímulo; ↓ = inibição; X = interrupção.

A alga *Fucus vesiculosus* é a espécie com mais estudos publicados, muito provavelmente pela disponibilidade de extratos padronizados sendo comercializados para uso experimental, e como suplemento nutricional (Figura 4). A estrutura da molécula é constituída basicamente de cadeia linear de monossacarídeos de L-fucose sulfatada (Cao *et al.*, 2018), para as quais foram observadas diversas atividades antitumorais. No trabalho de Ale e colaboradores (Ale *et al.*, 2011) foram testados os polissacarídeos de *Sargassum sp.* e *F. vesiculosus*. Análises químicas por HPAEC-PAD (cromatografia por troca aniônica em pH elevado acoplada com detecção amperométrica pulsada) demonstraram para o extrato bruto do polissacarídeo obtido de *Sargassum sp.* constituição monossacarídica composta principalmente de fucose, ácido glucurônico e sulfato; quantidades menores de outros monossacarídeos, como galactose, glicose, xilose, manose, ramnose e arabinose também foram detectadas. O extrato bruto do polissacarídeo obtido de *F. vesiculosus* apresentou padrão de monossacarídeos semelhante, porém com maiores proporções de fucose, galactose e xilose, comparando-se com o primeiro. Não foi encontrada diferença significativa no teor de sulfato dos dois polissacarídeos e ambos inibiram a proliferação de células de melanoma murino B16 de modo concentração-dependente, porém o efeito do polissacarídeo de *Sargassum sp.* causou efeito a partir de concentrações mais baixas.

FIGURA 4. O POLISSACARÍDEO SULFATADO RICO EM FUCOSE DA ALGA *F. vesiculosus* E SEUS PRODUTOS COMERCIALIZADOS

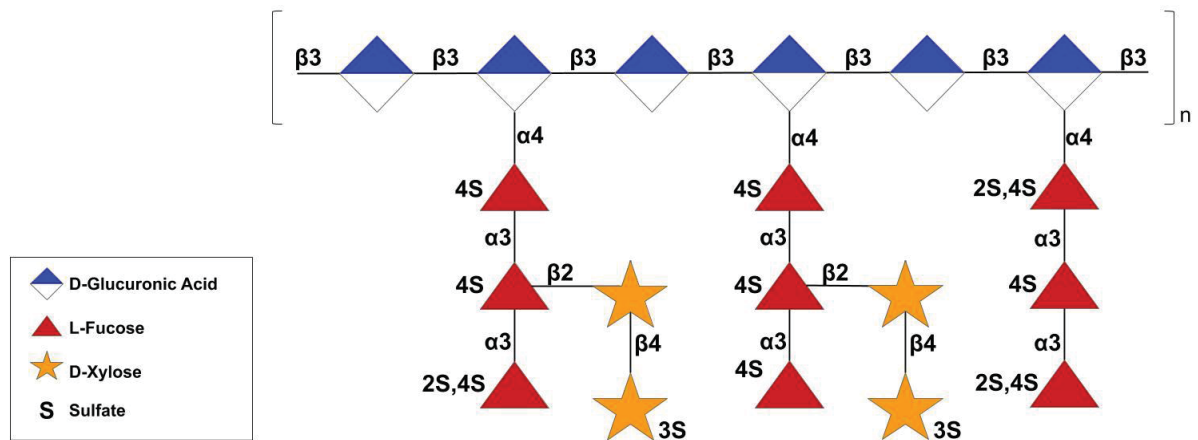


Fonte: Adaptado de (*Fucus Immune 30 Vegetarian Capsules*, *Sigma Fucoidan from Fucus vesiculosus*, *Skin Dewi Fucoidan (Skincare Organic)*).

Legenda: produtos da alga *Fucus vesiculosus* são comercializados com fim experimental, como cosméticos ou nutracêuticos.

A alga marrom *Spatoglossum schröderi* (Dictyotaceae) é uma espécie de distribuição global, da qual já foram isolados 3 polissacarídeos sulfatados, denominados Fucana A, B e C, classificados desta forma devido à diferença no perfil eletroforético. A Fucana A é uma molécula de 21 kDa composta por monossacarídeos de fucose, xilose, ácido glucurônico e sulfato, na proporção de aproximadamente 1:0.35:0.55:1.5, respectivamente (Leite *et al.*, 1998; Barroso *et al.*, 2008). Sua estrutura compreende uma cadeia principal de unidades de ácido glucurônico unidas por ligações do tipo β (1 \rightarrow 3), com substituições em C4 de trissacarídeos de fucose α -(1 \rightarrow 3) ligados. Algumas unidades de fucose são substituídas por grupos sulfato em C4, e em C2 por dissacarídeos de xilose β -(1 \rightarrow 4) ligados, que por sua vez também podem estar sulfatados, em C3 (Figura 5). A Fucana B é uma xilofucogalactana de 21.5 kDa (Rocha *et al.*, 2005); e a Fucana C, de 24 kDa, também é uma xilofucogalactana composta de fucose, xilose, galactose e sulfato, na proporção de 1:0.6:2:2.3, respectivamente (Rocha *et al.*, 2005).

FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DO POLISSACARÍDEO FUCANA A



Fonte: a autora

Legenda: A Figura acima ilustra, de forma esquemática, a estrutura da Fucana A proposta por Leite e colaboradores (1998)

A Fucana A é o polissacarídeo mais estudado dentre os 3 isolados, devido grandemente ao fato de corresponder à fração com maior rendimento (80%) (Almeida-Lima *et al.*, 2010a). No estudo de Leite e colaboradores (1998) foi observado que o tratamento com a Fucana A em células endoteliais de aorta de coelho não apresentou atividade anticoagulante, mas foi capaz de estimular a síntese do glicosaminoglicano antitrombótico heparan sulfato. A Fucana C apresentou atividade semelhante (Rocha *et al.*, 2005). A fim de se testar o efeito antitrombótico da Fucana A, foi realizado estudo em modelo experimental de trombose em ratos. Foi possível observar que após 8 horas de administração intravenosa o polissacarídeo exibiu um efeito antitrombótico dose-dependente, que também foi observado nas vias de administração subcutânea, intramuscular e intraperitoneal (Barroso *et al.*, 2008).

A seguir foi realizado um estudo para avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade *in vitro* da Fucana A (Almeida-Lima *et al.*, 2010), no qual foi observado que as células tumorais das linhagens PANC-1 (carcinoma pancreático), PC-3 (carcinoma de próstata), HL60 (leucemia promielocítica aguda) e HeLa (adenocarcinoma cervical) foram mais sensíveis ao tratamento, do que as células normais das linhagens murinas BALB/3T3 (fibroblastos) e RAW 264.7 (macrófagos), e de células de ovário de Hamster Chinês CHO.

Posteriormente foi realizado estudo para avaliar a toxicidade aguda e subcrônica da Fucana A em ratos Wistar, após administração subcutânea. Os resultados obtidos

demonstraram que não houve alteração dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, assim como da morfologia e tamanhos dos órgãos dos animais (Almeida-Lima *et al.*, 2011).

No estudo de Dantas-Santos e colaboradores (Dantas-Santos *et al.*, 2012), o nanogel de Fucana A inibiu consideravelmente a proliferação celular das linhagens tumorais HepG2, 786-0 e HS-5 e estimulou a proliferação de células das linhagens normais CHO e RAW 264.7. Ao analisarem o mecanismo de morte celular promovido pelo nanogel na linhagem 786-0, eles evidenciaram que a inibição da proliferação ocorria por mecanismos dependentes e independentes de caspases, além de ocorrer bloqueio das fases S e G2-M do ciclo celular. Mais recentemente Amorim e colaboradores (Rocha Amorim *et al.*, 2016) avaliaram os efeitos antiproliferativos do polissacarídeo na forma de nanopartículas de prata, sobre linhagens tumorais e normais, onde observaram que a Fucana A inibiu seletivamente a proliferação das células tumorais, sem causar alterações nas células normais.

Em estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa em modelo de melanoma murino, a Fucana A não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das linhagens testadas, as normais (Balb/3T3, de fibroblastos e RAW 264.7, de macrófagos) e a de melanoma B16-F10; mas inibiu a proliferação e reduziu a capacidade invasiva da linhagem tumoral (Ferreira, 2012; Santi, 2015; Maximo, 2019). A Fucana C também não apresentou citotoxicidade para as células, mas reduziu capacidade invasiva e migratória das células de melanoma (Santi, 2015). Em estudo *in vivo* a Fucana A foi testada em modelos de tumor sólido subcutâneo e de colonização/metástase pulmonar. Em tratamento terapêutico (injeções subcutâneas diárias, durante 10 dias, começando no 5º dia após inoculação das células de melanoma), foi capaz de reduzir o crescimento tumoral e a área de vasos intratumorais. Em tratamento preventivo (injeções subcutâneas diárias, durante 14 dias, começando 48h antes da inoculação das células de melanoma), reduziu o crescimento do tumor sólido e o número de nódulos no pulmão. A análise dos parâmetros fisiológicos, perfis hematológico e bioquímico, não mostraram alterações que indicassem toxicidade, confirmando que o polissacarídeo é seguro para uso *in vivo* (Bini, 2018).

Diante de atividades biológicas tão promissoras, além de serem obtidos de fontes abundantes na natureza, também passíveis de cultivo em larga escala, cujo manejo sustentável poderia gerar renda para comunidades habitantes da vasta área litorânea

brasileira, os polissacarídeos sulfatados ricos em fucose da alga marrom *Spatoglossum schröderi* se tornam fascinantes candidatos a agentes antitumorais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 6. INFOGRÁFICO DO ESTUDO



Fonte: a autora

3.1 Obtenção das fucanas A e C

Os polissacarídeos sulfatados objeto de estudo do presente trabalho são a Fucana A e a Fucana C, extraídas da alga *Spatoglossum schröderi* pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, Depto. Bioquímica, UFRN, de acordo com método previamente descrito (Barroso *et al.*, 2008). As amostras (a 20 mg/mL em D₂O) foram submetidas a análise por Ressonância Magnética Nuclear bidimensional, obtida em espectrofotômetro Bruker AVANCE III 400 MHz a 30 °C, para se averiguar a integridade dos extratos a serem utilizados nos experimentos.

Para os experimentos foram preparadas soluções aquosas (a 10 mg/mL),

denominadas soluções estoque, esterilizadas em filtros para seringas com poros de 0,22 µm (Merck Millipore). As soluções de tratamento com os polissacarídeos eram preparadas a partir de diluições das soluções estoque em meio de cultivo, nas concentrações definidas no delineamento experimental. Para o grupo controle (veículo), a solução de tratamento era preparada pela adição de água ultrapura (UP) esterilizada ao meio de cultivo, em volume equivalente ao utilizado de solução estoque dos polissacarídeos.

3.2 Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares humanas (Tabela 2) de melanoma A375, CHL-1 e SKMEL-147, e de melanócitos NGM, gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Roger Chammas, do Laboratório de Oncologia Experimental, ICESP/USP; e a linhagem de monócitos THP-1, gentilmente cedida pela Professora Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. As linhagens A375, CHL-1 e SKMEL-147 foram cultivadas em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco) contendo 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina (P3539, Sigma-Aldrich). A linhagem NGM foi cultivada em meio DMEM/F12 (Gibco) (1:1) contendo 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina, 10% de SFB e 1% do suplemento *Human Melanocyte Growth Supplement* (HMGS). A linhagem THP-1 foi cultivada em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 20% de SFB inativado. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

TABELA 2. CARACTERÍSTICAS DAS LINHAGENS CELULARES HUMANAS UTILIZADAS COMO MODELO EXPERIMENTAL

Linagem	Tipo de célula	Origem	Biorrepositório /Identificação	Mutação/ sequência da proteína
NGM	Melanócito	Nevos	BCRJ 0190	-
A375	Melanoma	Metástase	ATCC® CRL-1619™	<i>BRAF</i> (V600E) <i>CDKN2A</i> (E61e E69)
CHL-1	Melanoma	Tumor primário	ATCC® CRL-9446™	<i>CDKN2A</i> (p.W110*) <i>TP53</i> (p.H193R)
SKMEL-147	Melanoma	Metástase	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center	<i>NRAS</i> (Q61R)
THP-1	Monócito	Leucemia aguda	ATCC® TIB-202™	<i>CDKN2A</i> (?) <i>NRAS</i> (G12D) <i>TP53</i> (R174fs*3)

Fonte: a autora (2020)

3.3 Análise de viabilidade e densidade celular

Linhas A375 (500 células), CHL-1 (1000 células), NGM (1000 células) e SKMEL-147 (1500 células): foram plaqueadas em placas de 96 poços e, após aproximadamente 24h de incubação para garantir adequada aderência e espreado, foram incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos nas concentrações definidas no delineamento experimental.

Monócitos da linhagem THP-1 (20000 células): foram plaqueadas em placas de cultivo de 96 poços, em meio de cultivo 10 ng/mL de contendo forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), para a diferenciação e consequente adesão das células. Após 24h de incubação, as células já aderidas foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e incubadas por mais 24h em meio de cultivo (*resting time*). A seguir foram incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos nas concentrações definidas no delineamento experimental.

A viabilidade celular foi medida através da capacidade de retenção celular do corante vermelho neutro (Repetto, del Peso e Zurita, 2008) e a determinação da densidade celular em cada grupo foi feita por coloração com cristal violeta (Vega-Avila e Pugsley, 2011). Após exposição de até 72h, o meio de cultivo foi substituído por um novo, contendo 40 µg/mL do corante Vermelho Neutro (VN) (Sigma-Aldrich), com o qual as células foram incubadas por 2h. O corante internalizado foi extraído das células através

de eluição com solução de etanol 50% e ácido acético 1% em água destilada. Após leitura da absorbância em leitor de microplaca (Biotek Epoch) a 540 nm, os poços foram lavados com água destilada e as células foram então incubadas por 10 minutos com solução aquosa de corante Cristal Violeta (CV) (Merck) a 0,25 mg/mL. O corante foi extraído das células através de eluição com solução de ácido acético 33% em água destilada e a leitura da absorbância foi feita a 570 nm. A quantificação do número de células foi determinada através de relação da absorbância do corante CV em densidades celulares conhecidas: as células foram plaqueadas em número crescente (de 937.5 a 30000 células por poço) nas mesmas condições descritas para a realização dos experimentos. Após incubação por 12h para a aderência, as células foram fixadas e incubadas com o corante CV. Com as absorbâncias obtidas, foi construído um gráfico de dispersão do qual a equação de reta resultante foi utilizada para determinação da densidade celular. Os tempos de duplicação foram calculados com o valor da mediana do número de células obtido em cada uma das condições de tratamento, através da equação: $TD = T \cdot \log 2 / (\log D_f - \log D_i)$; onde TD é o tempo de duplicação; T é o tempo de exposição, D_f é o número de células no início do tempo de incubação e D_i é o número de células no final do tempo de incubação (*Doubling Time - Online computing with 2 points*).

3.4 Análise de viabilidade e densidade celular na presença do quimioterápico Cisplatina

Células das linhagens A375 (500 células) e CHL-1 (1000 células) foram plaqueadas em placas de 96 poços e, após aproximadamente 24h de incubação para garantir adequada aderência e espraçamento, foram incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos Veículo (água UP esterilizada, 1:100 v/v); ou Fucana A 100 µg/mL e/ou Cisplatina (Sigma-Aldrich) 5 µM (solução estoque a 1.67 mM em solução de NaCl 0.9%). Após exposição de 72h, o meio de cultivo foi substituído por um novo, contendo 40 µg/mL do corante VN, com o qual as células foram incubadas por 2h. O corante internalizado foi extraído das células através de eluição com solução de etanol 50% e ácido acético 1% em água destilada. Após leitura da absorbância em leitor de microplaca a 540 nm, os poços foram lavados com água destilada e as células foram então incubadas por 10 minutos com solução aquosa de corante CV a 0,25 mg/mL. O corante foi extraído das células através de eluição com solução de ácido acético 33% em

água destilada e a leitura da absorbância foi feita a 570 nm. A quantificação do número de células foi determinada através de relação da absorbância do corante CV em densidades celulares conhecidas.

3.5 Ensaio de ciclo celular

O ensaio foi realizado conforme sugerido pelo fabricante do reagente utilizado para análise de ciclo celular (PI/RNase Staining Buffer, 550825 BD Pharmingen™). O Iodeto de Propídeo é um corante fluorescente, intercalante de DNA, amplamente utilizado na quantificação de DNA por citometria de fluxo. Células das linhagens A375 (15000 células) e CHL-1 (55000 células) foram plaqueadas em placas de 6 poços. Passadas 24h do plaqueamento, para garantir a estabilização e completa adesão das células, foram incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos Veículo (água UP esterilizada); ou Fucana A 100 µg/mL. Após 72h de tratamento, os poços foram lavados com PBS a 37°C e as células desaderidas com solução de tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) em PBS. A suspensão de células resultante foi transferida para tubos de 15 mL e lavada com PBS por centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos. A seguir as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 2% diluído em PBS por 30 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, por centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos. Em seguida as células foram ressuspensas em 1 mL de álcool 70% e mantidas a -20°C por 24 horas. Para análise por citometria de fluxo as células foram lavadas duas vezes com PBS por centrifugação a 1800 rpm por 3 minutos e contadas em câmara de Neubauer. O volume equivalente a 1×10^6 células foi transferido para tubos de citometria, centrifugado e as células ressuspensas em 1 mL de solução de PI/RNase. Após incubação por 15 minutos, as células foram analisadas por citometria de fluxo, que foi realizada em equipamento FACSVerse (BD Biosciences). A análise dos dados adquiridos foi feita no software FlowJo.

3.6 Ensaio de formação de vasos com células de melanoma (mimetismo vasculogênico)

O ensaio foi realizado conforme descrito por Hendrix e colaboradores (Hendrix *et al.*, 2016), com modificações. Células da linhagem CHL-1 foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços e, após

aproximadamente 12h de incubação para adequada aderência e espreadimento, a monocamada foi coberta por Matrigel (Corning) (3 mg/mL, 20 uL/lamínula). Após 30 minutos de incubação para a gelificação do Matrigel, foram adicionadas soluções de tratamento Veículo (água UP esterilizada); ou Fucana A 100 µg/mL, em meio DMEM com SFB 1%. Após 24h de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 2%; a permeabilização e o bloqueio foram feitos com solução de saponina a 0,01% e albumina bovina (BSA) a 1% e a seguir os filamentos de actina foram marcados com o reagente *ActinGreen* 488 (ThermoFisher) e o núcleo marcado com DAPI (1 µg/mL; ThermoFisher). As lâminas foram montadas com Fluormount-G (EMS) e as lamínulas escaneadas em microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems). As imagens foram analisadas no programa ImageJ.

3.7 Análise de expressão gênica

Células da linhagem CHL-1 (55000 células) foram plaqueadas em placas de 6 poços e, após aproximadamente 24h de incubação para garantir adequada aderência e espreadimento, foram incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos Veículo (água UP esterilizada) ou Fucana A 100 µg/mL. Após 72h de exposição o RNA total foi extraído usando o kit *EZNA® Total RNA Kit 1* (Omega Bio-Tek), de acordo com as recomendações do fabricante, e posteriormente quantificado por medição de densidade óptica (razão A260/A280) em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare). A síntese de cDNA foi realizada em termociclador (Eppendorf AG 22331) usando o Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. A análise da expressão gênica por RT-qPCR foi realizada utilizando placas de 96 poços *Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT² Profiler PCR Array* (SABioscience/Qiagen). A amplificação e captura da fluorescência (*RT² SYBR Green ROX™ qPCR Mastermix*; SABioscience/Qiagen) foi realizada em termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems). O *cycle threshold* (Ct) de cada poço foi determinado de forma automatizada, pelo software do termociclador (software StepOne v2.3). Foi realizada ainda análise da curva de dissociação, para confirmar uma única sequência amplificada. Para normalização foi utilizado o gene hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT), uma vez que foi o gene de referência com menores variações de Ct em todas as amostras. A quantificação relativa foi calculada pelo método

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) e expressa em *fold regulation*. Foram considerados genes diferencialmente expressos os que obtiveram valores $\geq 1,5$ em relação ao grupo veículo.

3.8 Análise de densidade celular na presença do anticorpo anti-CD44: Ensaio de competição

Células da linhagem CHL-1 (1500 células) foram plaqueadas em placas de 96 poços e, após aproximadamente 24h de incubação para garantir adequada aderência e espraio, foram incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos Veículo (água UP esterilizada); ou Fucana A 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e/ou o anticorpo anti-CD44 (555479 BD Pharmingen™). Após exposição de 72h, as células foram fixadas por 20 minutos com solução de etanol 50% e ácido acético 1% em água destilada. Após lavagem dos poços com água destilada, as células foram incubadas por 10 minutos com solução aquosa de corante CV a 0,25 mg/mL . O corante foi extraído das células através de eluição com solução de ácido acético 33% em água destilada e a leitura da absorbância foi feita a 570 nm em leitor de microplaca foi feita a 570 nm, e o número de células relativo a absorbância foi determinado através de curva padrão de número de células.

3.9 Conjugação da Fucana A ao fluoróforo DTAF

O procedimento foi realizado conforme descrito por Prigent-Richard e colaboradores (Prigent-Richard *et al.*, 1998), com modificações. O fluoróforo DTAF (dicloro-triazinilamino fluoresceína; Sigma-Aldrich) foi solubilizado (10 mg/mL) em DMSO (Sigma-Aldrich) e posteriormente misturado a uma solução de Fucana A (2 mg/mL) em tampão borato 0.1M (pH 8.5), na proporção de 10:1 (Fucana A:DTAF). A mistura foi mantida sob agitação por aproximadamente 12h. O DTAF livre foi separado da solução Fucana A-DTAF através de uma série de lavagens com água UP (aproximadamente 4 lavagens, filtrado translúcido) utilizando tubos de centrifugação Amicon-Ultra com membrana para retenção de moléculas maiores que 10 KDa. O filtrado foi coletado e armazenado a 4°C e ao abrigo da luz.

3.10 Análises por microscopia de varredura a laser confocal

3.10.1 Análises de morfologia e detecção de proteínas β -catenina e Ki-67

Células das linhagens A375 (1600 células) e CHL-1 (6575 células) foram plaqueadas em lâminas de 8 poços *Lab-Tek® Chamber Slide™* (Nunc) e, após aproximadamente 24h de incubação para garantir adequada aderência e espraçamento, foram incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos Veículo (água UP esterilizada); ou Fucana A 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 72h de exposição, as células foram e fixadas com solução de PFA a 2% em PBS. A permeabilização e o bloqueio foram feitos com solução de saponina a 0,01% e BSA a 1% em PBS. Para as análises de morfologia celular os filamentos de actina foram marcados com o reagente *ActinGreen 488* e o núcleo marcado com DAPI. Para as análises de expressão proteica as células foram incubadas por 1 h com os anticorpos primários anti- β -catenina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; sc-7199 Santa Cruz Biotechnology) e anti-Ki-67 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 556003 BD Pharmingen™), em seguida com os respectivos anticorpos secundários conjugados com os fluoróforos Alexa 594 e 488 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ThermoFisher) e os núcleos marcados com DAPI. As lâminas foram montadas utilizando o meio de montagem Fluoromount G e as imagens obtidas em microscópio de varredura a laser confocal A1R+MP (Nikon, Minato, Tóquio, Japão). As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ.

3.10.2 Análise de localização da ligação da Fucana A

Células das linhagens A375 (30000 células) e CHL-1 (40000 células) foram plaqueadas em lâminas de 8 poços *Lab-Tek® Chamber Slide™*, após aproximadamente 24h de incubação para garantir adequada aderência e espraçamento, foram incubadas em meio de cultivo contendo a Fucana A a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ conjugada ao DTAF. Após período de incubação de 24h, o meio de cultivo foi trocado por outro contendo o anticorpo anti-CD44 conjugado ao fluoróforo PE (*phycoerythrin*; 1:100; 550989 BD Pharmingen™) e o fluoróforo Hoechst (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ThermoFisher). Após 1h de incubação as células foram fixadas com solução de PFA a 2% em PBS. As lâminas foram montadas utilizando o meio de montagem Fluoromount G e as imagens obtidas em microscópio de varredura a laser confocal A1R+MP (Nikon, Minato, Tóquio, Japão). As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ.

3.11 Ensaio de invasão celular

Células das linhagens A375 (7500 células) e SKMEL-147 (25000 células) foram plaqueadas em placas de 12 poços e, após aproximadamente 24h de incubação para adequada aderência e espraiamento, incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos Veículo (água UP esterilizada); ou Fucana A 100 µg/mL; ou Fucana C 100 µg/mL. Após 72h de incubação, as células foram desaderidas com solução de EDTA 2 mM em PBS, centrifugadas e ressuspendidas em meio de cultivo sem SFB. Após contagem por grupo, 80000 células foram plaqueadas em insertos tipo *transwell* com membranas de policarbonato com poros de 8 µm e revestidos com Matrigel (3 mg/mL, 35 µL/poço), contidos em placas de 24 poços. Para criar o gradiente quimioatratante, foi adicionado aos poços meio de cultivo com 10% de SFB, na parte externa dos insertos. Após período de incubação 48h (para a linhagem A375) e 72h (para a linhagem SKMEL-147) as células foram fixadas com paraformaldeído 2% e marcadas com Actin Green (citoesqueleto de actina) e DAPI (núcleo). As células que permaneceram na superfície superior da membrana foram removidas mecanicamente, com o auxílio de hastes flexíveis com ponta de algodão. As membranas foram então cortadas dos insertos com bisturi, para a montagem das lâminas com Fluormount-G. As membranas foram escaneadas em microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSslide (Metasystems). A quantidade de células que invadiram foi determinada a partir da quantificação dos núcleos usando programa ImageJ e normalizado pela área de cada inserto analisado.

3.12 Ensaio de migração celular

Células das linhagens A375 (7500 células) e SKMEL-147 (25000 células) foram plaqueadas em placas de 12 poços e, após aproximadamente 24h de incubação para adequada aderência e espraiamento, incubadas em meio de cultivo contendo os tratamentos Veículo (água UP esterilizada); ou Fucana A 100 µg/mL; ou Fucana C 100 µg/mL. Após 72h de exposição, as células foram desaderidas com solução de EDTA 2mM em PBS, centrifugadas e ressuspendidas em meio de cultivo com SFB 10%. Após contagem por grupo, 35000 células foram plaqueadas em placas circulares de 4 poços com fundo de vidro e incubadas por aproximadamente 12h para adequada aderência e espraiamento. A seguir, para se evitar a proliferação celular e assim garantir que o

preenchimento da área livre fosse decorrente exclusivamente de movimento migratório, as células foram incubadas por 2h com meio de cultivo contendo 10 µg/mL de Mitomicina (Abcam). A seguir foi feito o risco na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira de 10µL, criando uma área livre de células. Para remover os debris celulares, a monocamada foi lavada com meio de cultivo sem SFB a 37°C. Para visualizar o preenchimento da área livre de células, a placa foi mantida em câmara úmida de CO₂ acoplada a microscópio a laser confocal A1R MP (Nikon), por aproximadamente 18h, sendo obtidas imagens de dois campos por poço, a cada 20 minutos. A área de migração foi calculada a partir da análise das imagens através do *plugin MRI Wound Healing Tool* do programa ImageJ.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

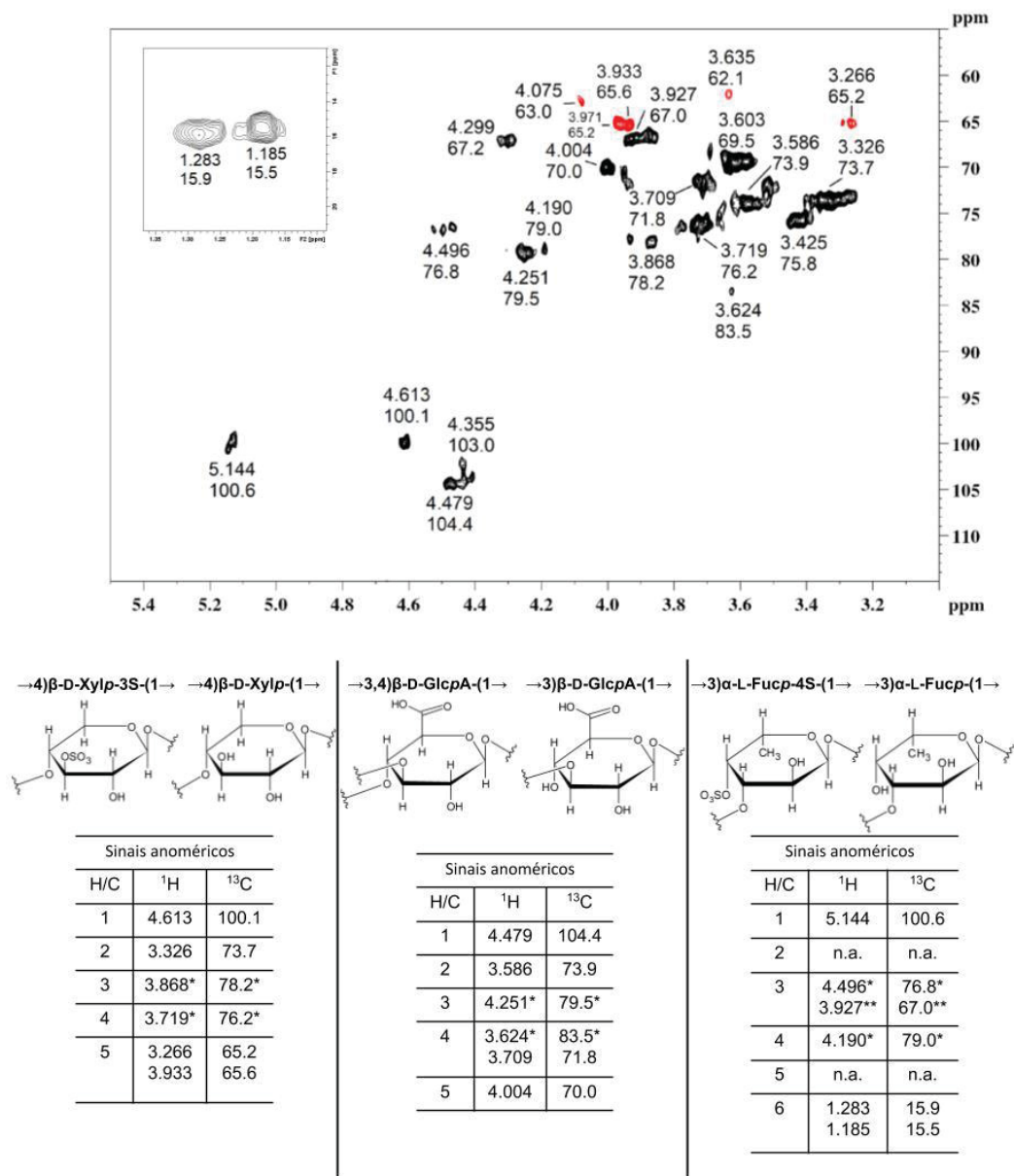
4.1 Análise das amostras dos Polissacarídeos

Os polissacarídeos sulfatados ricos em fucose objetos de estudo do presente trabalho foram extraídos e purificados da alga marrom *Spatoglossum schroederi* em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pelo professor Hugo Rocha, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Essas moléculas são classificadas como fucoidanas, sendo que a estrutura química da Fucana A foi caracterizada por Leite e colaboradores (Leite *et al.*, 1998) e a da Fucana C ainda não foi totalmente elucidada, havendo publicada apenas a proporção de monossacarídeos e grupamento sulfato (Rocha *et al.*, 2005).

Na análise por Ressonância Magnética Nuclear bidimensional de correlação ¹H/¹³C (Figura 7), os sinais anoméricos em δ 4.479/104.4, δ 4.613/100.1, e δ 5.144/100.6 foram atribuídos às unidades de β-D-GlcpA, β-D-Xylp, e α-L-Fucp, respectivamente (Leite *et al.*, 1998; Ishii *et al.*, 2010; Mansour *et al.*, 2019). Sinais em δ 4.251/79.5, δ 4.496/76.8, e δ 3.719/76.2 foram sinais com deslocamento para campo mais baixo de H3/C3 das unidades β-D-GlcpA 3-O-ligadas, de H3/C3 das α-L-Fucp 3-O-ligadas e de H4/C4 das β-D-Xylp 4-O-ligadas, respectivamente (Simas *et al.*, 2004; Ishii *et al.*, 2010; Mansour *et al.*, 2019). O padrão de sulfatação das unidades de xilose e fucose foram inferidos pelos sinais em δ 3.868/78.2 e δ 4.190/79.0, que são atribuídos ao H3/C3 da Xylp 3-O-sulfatada e H4/C4 da Fucp 4-O-sulfatada (Leite *et al.*, 1998). Assim, a análise de RMN foi

importante para confirmar que a estrutura química da amostra utilizada no presente estudo se trata da mesma proposta por Leite e colaboradores (1998), sendo ela uma xilofucoglucoronana composta por cadeia principal de unidades de β -(1 \rightarrow 3)-Glc p A 4-O-substituída por unidades trissacarídicas de α -(1 \rightarrow 3)-Fuc p , que pode ser 4-O-sulfatada ou -substituída, por unidades dissacarídicas de β -(1 \rightarrow 4)-Xyl p , que por sua vez pode ser 3-O-sulfatada.

FIGURA 7. ANÁLISE DA AMOSTRA DA FUCANA A UTILIZADA NOS ENSAIOS



Fonte: a autora

Legenda: A amostra de Fucana A foi analisada por RMN bidimensional (¹H/¹³C) HSQC. * siniais com deslocamento para campo mais baixo de H3/C3. ** siniais com deslocamento para campo mais alto decorrente das β -substituições.

4.2 Análise de viabilidade e densidade celular das linhagens de melanoma de diferentes subtipos moleculares

Grande parte das drogas antitumorais atualmente utilizadas causam efeitos deletérios, sem distinção entre células tumorais e normais, o que resulta em efeitos colaterais muitas vezes graves, que prejudicam a qualidade de vida dos pacientes. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa se interessa pelo estudo de moléculas que possam modular fenótipos tumorais das células cancerosas, mas que não as levem à morte e, que também não causem danos às células normais.

Os estudos de Hanahan e Weinberg (Hanahan e Weinberg, 2011) se tornaram uma grande referência no estabelecimento dos fenótipos tumorais adquiridos pelas células cancerosas, que contribuem para a progressão tumoral, como a autossuficiência dos sinais de proliferação e a evasão do controle do ciclo celular. Assim, o primeiro passo do presente estudo foi avaliar se a presença dos polissacarídeos poderia causar efeito citotóxico, de tal forma que altere a viabilidade celular; ou citostático, alterando apenas proliferação celular. Para isso, células das linhagens tumorais A375, CHL-1 e SKMEL-147, e as linhagens não tumorigênicas de melanócitos NGM e de macrófagos derivados de monócitos THP-1 foram expostas aos polissacarídeos e submetidas a dois processos de incorporação de corantes, a saber: o vermelho neutro (VN), que é um corante vital e neutro, capaz de penetrar membranas intactas, e que, uma vez dentro das vesículas ácidas, é conseqüentemente protonado e ali retido, assim denotando as células viáveis; e o corante cristal violeta (CV), que se liga ao DNA e proteínas nucleares, sendo assim um indicativo de densidade celular. Conforme descrito na seção Material e Métodos, a análise de densidade celular foi realizada consecutivamente à análise de viabilidade celular, ou seja, as células foram expostas aos polissacarídeos, a seguir incubadas com o corante VN e, após eluição deste, incubadas com o corante CV. Ainda conforme descrito na seção Material e Métodos, a quantificação do número de células foi determinada através de relação da absorbância do corante CV em densidades celulares conhecidas.

A seleção das concentrações dos polissacarídeos se baseou em estudos anteriores com a Fucana A, publicados pelo grupo de pesquisa do professor Hugo Rocha, onde o efeito desse polissacarídeo também foi investigado através de um ensaio colorimétrico, mas com o composto MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil

tetrazólio]). Tal ensaio avalia a atividade das enzimas desidrogenases, presentes em células metabolicamente viáveis, capazes de reduzir o anel tetrazólio do composto, formando cristais de formazana de cor roxa. No presente estudo optou-se por utilizar o corante VN, segundo recomendação do *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), que considera a quantificação do VN retido nas células como ensaio padrão de citotoxicidade (ICCVAM, 2006).

No estudo de Almeida-Lima colaboradores (2010) a Fucana A foi testada nas linhagens celulares tumorais humanas PANC-1 (carcinoma pancreático), PC-3 (carcinoma de próstata), HL60 (leucemia promielocítica aguda) e HeLa (adenocarcinoma cervical); nas linhagens normais murinas BALB/3T3 (fibroblastos) e RAW 264.7 (macrófagos) e de células de ovário de Hamster Chinês CHO. Nesse estudo foram utilizadas as concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL, com tempo de exposição de 24h, e a diminuição de formação dos cristais de formazana foi relacionada à inibição da proliferação. Todas as linhagens tumorais foram afetadas pela presença da Fucana A, sendo que para as linhagens PANC-1 e HL-60 houve diminuição de cristais em todas as concentrações testadas (variando de 12.5 a 44%), e para as linhagens HeLa e PC-3 a partir da concentração de 100 µg/mL (variando de 15 a 45%). Já as linhagens normais CHO e RAW 264.7 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das concentrações testadas, mas a linhagem de fibroblastos Balb/3T3 apresentou diminuição de cristais estatisticamente significativa a partir da concentração de 100 µg/mL (variando de 5 a 20%). Em estudo mais recente, de Rocha Amorim e colaboradores (Rocha Amorim *et al.*, 2016) a Fucana A foi testada pelo mesmo tempo de exposição, e a maior concentração utilizada foi de 100 µg/mL, para a qual houve diminuição da formação de cristais estatisticamente significativa (aproximadamente 40%) na linhagem de melanoma murino B16F10.

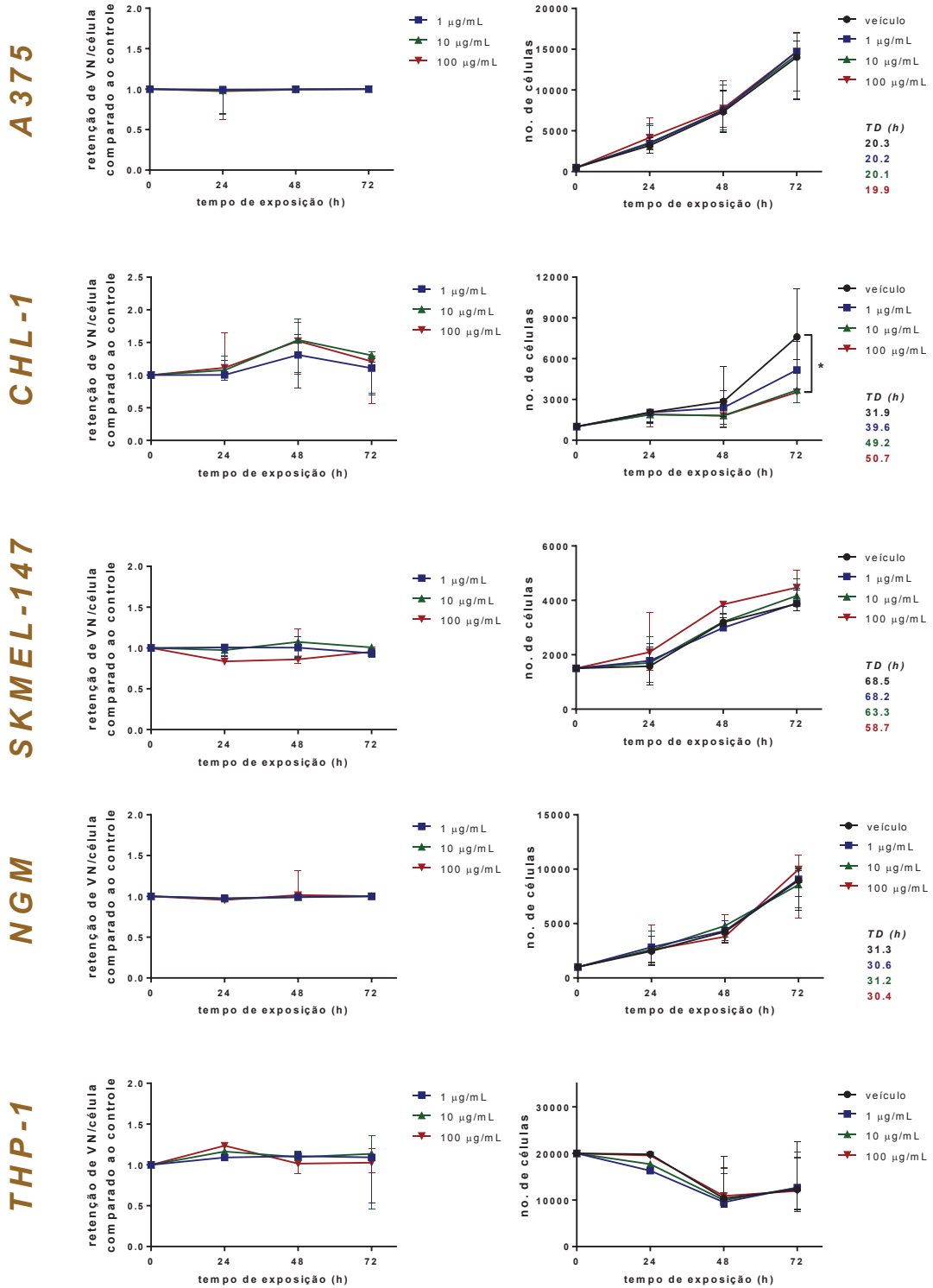
Assim, para o presente estudo, o primeiro passo foi investigar a ação dos polissacarídeos da alga marrom *Spatoglossum schröderi* (Fucana A e C) em modelo de melanoma humano, utilizando também a concentração máxima estabelecida por Rocha Amorim e colaboradores (2016) (100 µg/mL), visto que resultou em diminuição estatisticamente significativa do metabolismo celular de diversas linhagens tumorais - inclusive de melanoma murino - mas também da linhagem normal de fibroblastos Balb/3T3. As demais concentrações foram determinadas, novamente conforme recomendado pelo ICCVAM, através de diluições seriadas na proporção de 1:10, partindo-se da máxima estabelecida. Ainda, considerando-se que os outros ensaios para

avaliação de fenótipos tumorais poderiam ser executados com duração maior do que 24h adotou-se mais dois tempos de exposição, de 48 e 72h.

Os gráficos das Figuras 8 e 10 englobam os resultados obtidos nas análises de viabilidade e densidade celular. Considerando que são as mesmas células submetidas aos dois processos de coloração, julgou-se mais apropriada a quantificação da viabilidade celular em razão do número de células obtido pela coloração com o CV. As colunas à esquerda, demonstram que nenhum dos polissacarídeos alterou a capacidade de retenção do VN em nenhuma das linhagens utilizadas. Porém é possível observar que há um indício de aumento de retenção do corante VN nas células da linhagem CHL-1, após 48h de exposição à Fucana A, em todas as concentrações testadas.

Em relação à densidade celular (colunas à direita), não foram encontradas alterações significativas de números de células em nenhuma das linhagens tratadas com o polissacarídeo Fucana C. Já o tratamento com a Fucana A causou diminuição de aproximadamente 53% na densidade celular da linhagem CHL-1, nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL. O tempo de dobramento na concentração de 100 µg/mL aumentou aproximadamente 1,6 vezes, de 31.9 no grupo veículo para 50.7 h no grupo tratado. No acompanhamento visual das células ao microscópio, durante e após o término dos períodos de exposição, não foram evidenciadas células soltas que pudessem indicar efeito citotóxico e consequente desaderência e morte celular (Figura 9). Portanto o resultado obtido sugere efeito citostático desse polissacarídeo, inibindo a proliferação celular na linhagem CHL-1. Tal resultado é muito interessante, por se tratar de uma representante da classificação genômica triplo negativa.

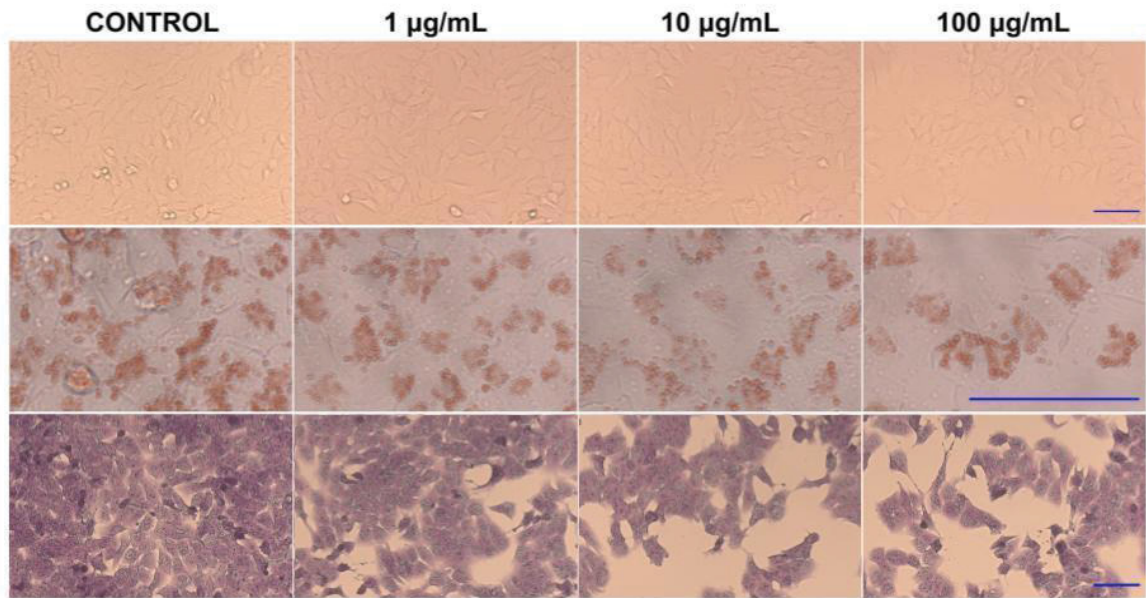
FIGURA 8. VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AO POLISSACARÍDEO FUCANA A



Fonte: a autora

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de viabilidade (coluna à esquerda) e densidade (coluna à direita) celular. TD = tempo de duplicação. Os gráficos representam mediana ± range de pelo menos 3 experimentos independentes em triplicata. Teste t pareado. *p<0.05

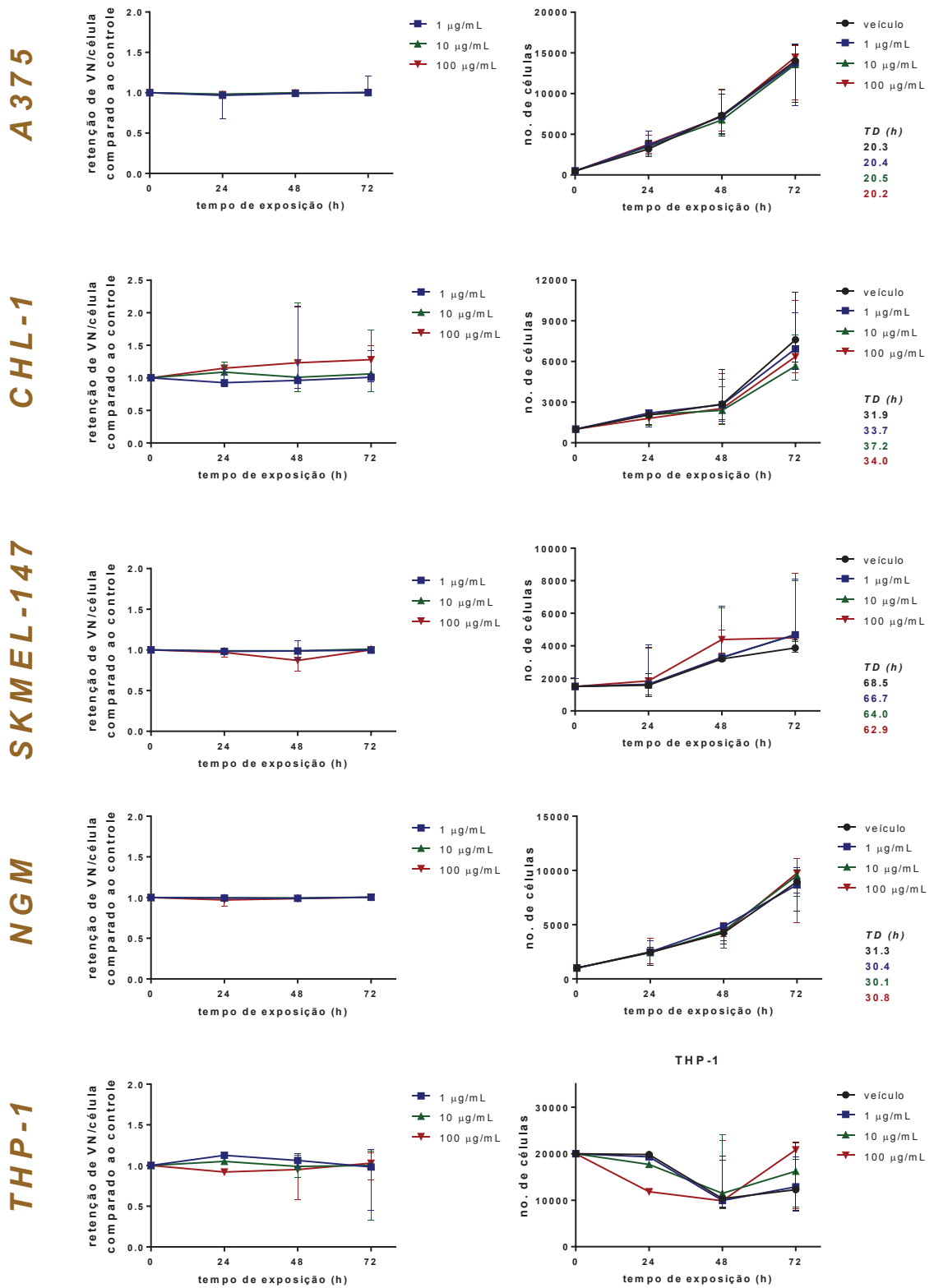
FIGURA 9. ANÁLISE DE VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR DA LINHAGEM CHL-1 APÓS EXPOSIÇÃO À FUCANA A



Fonte: a autora

Legenda: Linha superior, monocamada de células logo após o término de 72h de tratamento; Linha central, monocamada de células após incubação com o corante vermelho neutro; Linha inferior, monocamada de células após incubação com o corante cristal violeta. Barra de escala = 100 µm

FIGURA 10. VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AO POLISSACARÍDEO FUCANA C



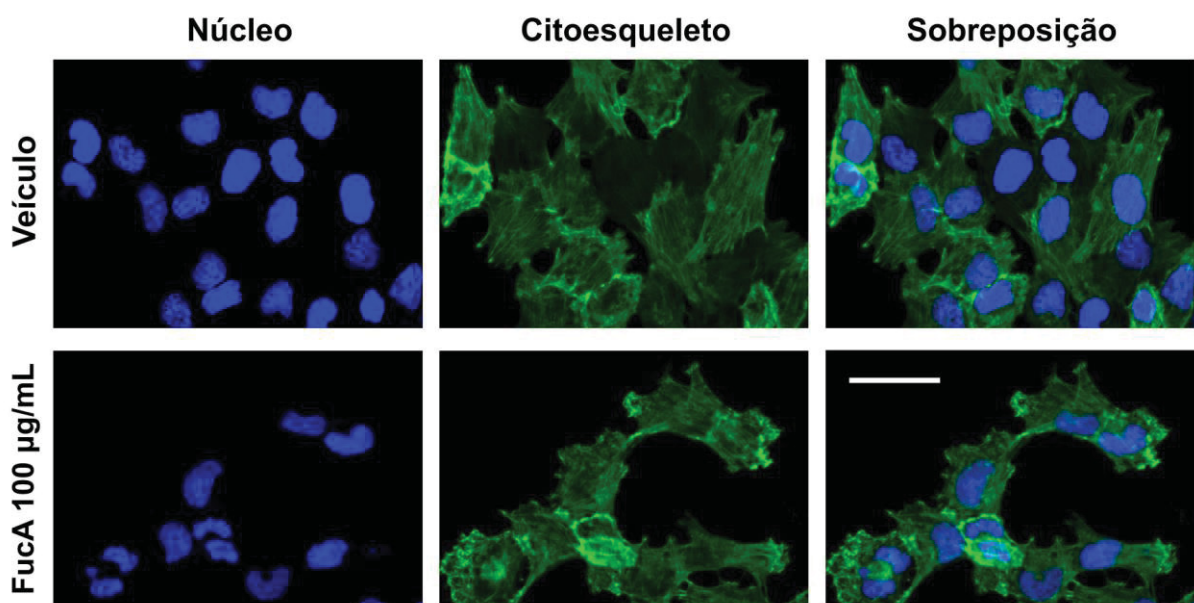
Fonte: a autora

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de viabilidade (coluna à esquerda) e densidade (coluna à direita) celular. TD = tempo de duplicação. Os gráficos representam mediana ± range de pelo menos 3 experimentos independentes em triplicata.

4.2.1 Análise de morfologia celular da linhagem CHL-1 após tratamento com a Fucana A

O fato de as células CHL-1 apresentarem maior retenção do corante VN também pode estar relacionado à formação de lisossomos devido a processos autofágicos, decorrentes dos tratamentos em si; ou da produção de espécies reativas de oxigênio, em resposta aos tratamentos (Banafa *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2017). Dessa forma, era necessário confirmar se os efeitos da Fucana A realmente não estavam causando citotoxicidade na linhagem CHL-1. Para isso, foi selecionada a maior concentração do polissacarídeo e o maior tempo de exposição para análise de morfologia celular, considerando que durante os eventos apoptóticos as células sofrem mudanças nas organelas que podem ser evidenciadas em análises de morfologia, como despolimerização de citoesqueleto de actina e perda de aderência à matriz extracelular; formação de *blebs* de membrana plasmática e de núcleos picnóticos, com condensação e fragmentação da cromatina (Toné *et al.*, 2007; Chen, Kang e Fu, 2018). Na Figura 11 é possível observar as células com núcleos e citoesqueleto marcados, demonstrando que não há alteração de morfologia celular, após tratamento com a Fucana A.

FIGURA 11. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR DE CÉLULAS DA LINHAGEM CHL-1 APÓS EXPOSIÇÃO À FUCANA A



Fonte: a autora

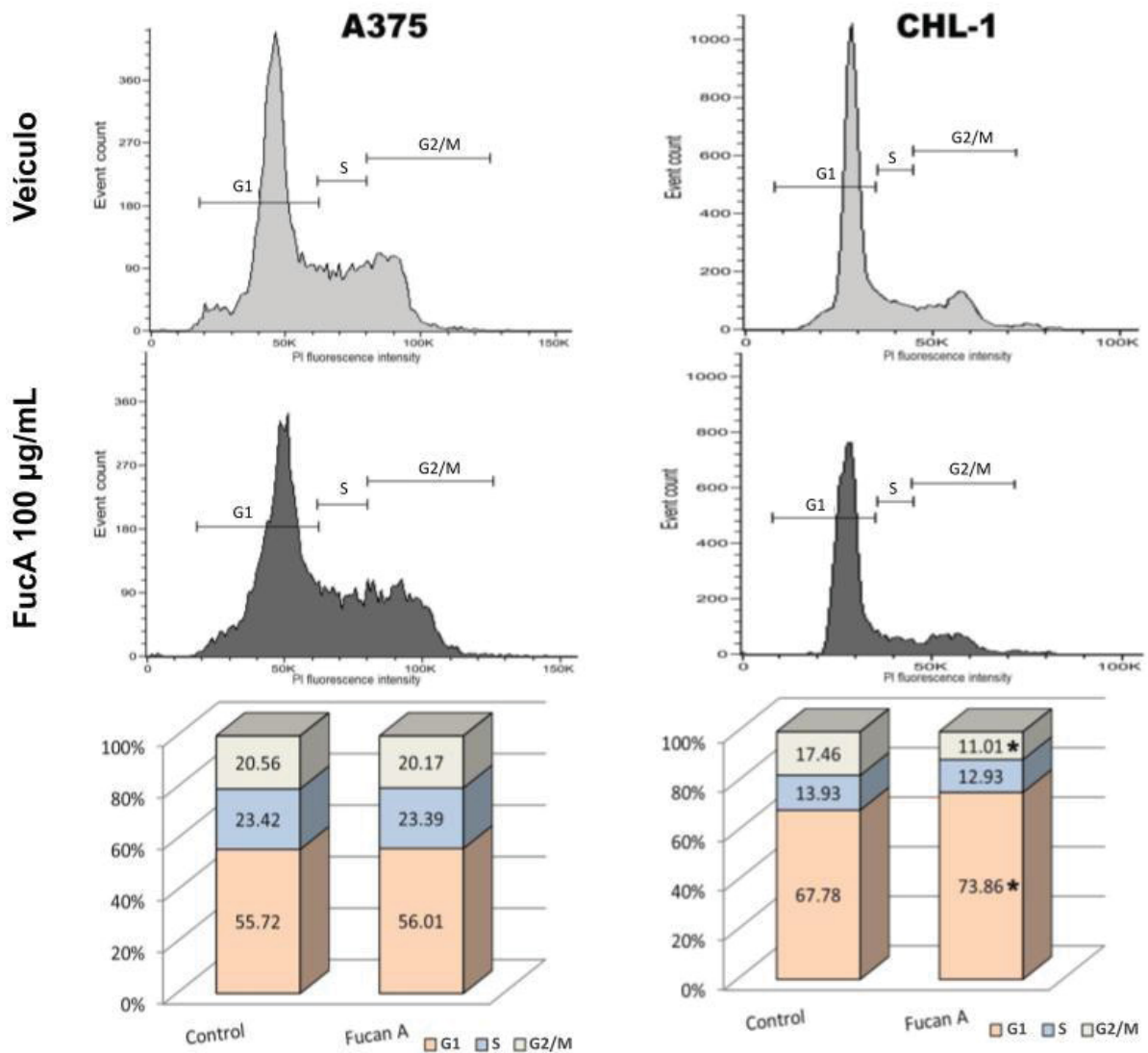
Legenda: imagens representativas da análise de morfologia celular após 72h de tratamento com a Fucana A 100 µg/mL. Núcleos estão marcados em azul (DAPI) e o citoesqueleto de actina em verde (faloidina). Barra de escala = 50 µm.

4.2.2 Análise de ciclo celular da linhagem CHL-1 após tratamento com a Fucana A

Para confirmar o efeito citostático da Fucana A foi realizada análise de ciclo celular (após exposição de 72h a 100 µg/mL), através de quantificação do DNA marcado com o fluoróforo iodeto de propídeo (PI), por citometria de fluxo. O ensaio foi realizado com a linhagem afetada pela Fucana A (CHL-1) e, como referência para comparação, com a linhagem A375, por não haver demonstrado diferenças no ensaio de densidade celular, bem como por apresentar alta taxa replicativa (tempo de duplicação médio de 19h) e ser uma representante do subtipo molecular mais frequente no melanoma (*BRAF* mutante).

O resultado dessa análise evidencia que somente na linhagem CHL-1 houve aumento estatisticamente significativo da população de células na fase G1, confirmando assim o efeito antiproliferativo da Fucana A nessa linhagem. Além disso, como não houve formação de pico anterior à fase G1, característico de células com DNA fragmentado, em conjunto com os dados anteriores, pode-se concluir que o tratamento realmente não causa morte celular.

FIGURA 12. ANÁLISE DE CICLO CELULAR DAS LINHAGENS A375 E CHL-1 APÓS EXPOSIÇÃO À FUCANA A



Fonte: a autora

Legenda: Histogramas e gráficos representativos dos resultados obtidos na análise de ciclo celular após 72h de tratamento com a Fucana A à 100 µg/mL. Foram realizados 3 experimentos independentes em duplicata. Teste t pareado. *p<0,05.

4.2.3 Análise do efeito citostático do tratamento combinado Fucana A e Cisplatina em células da linhagem CHL-1

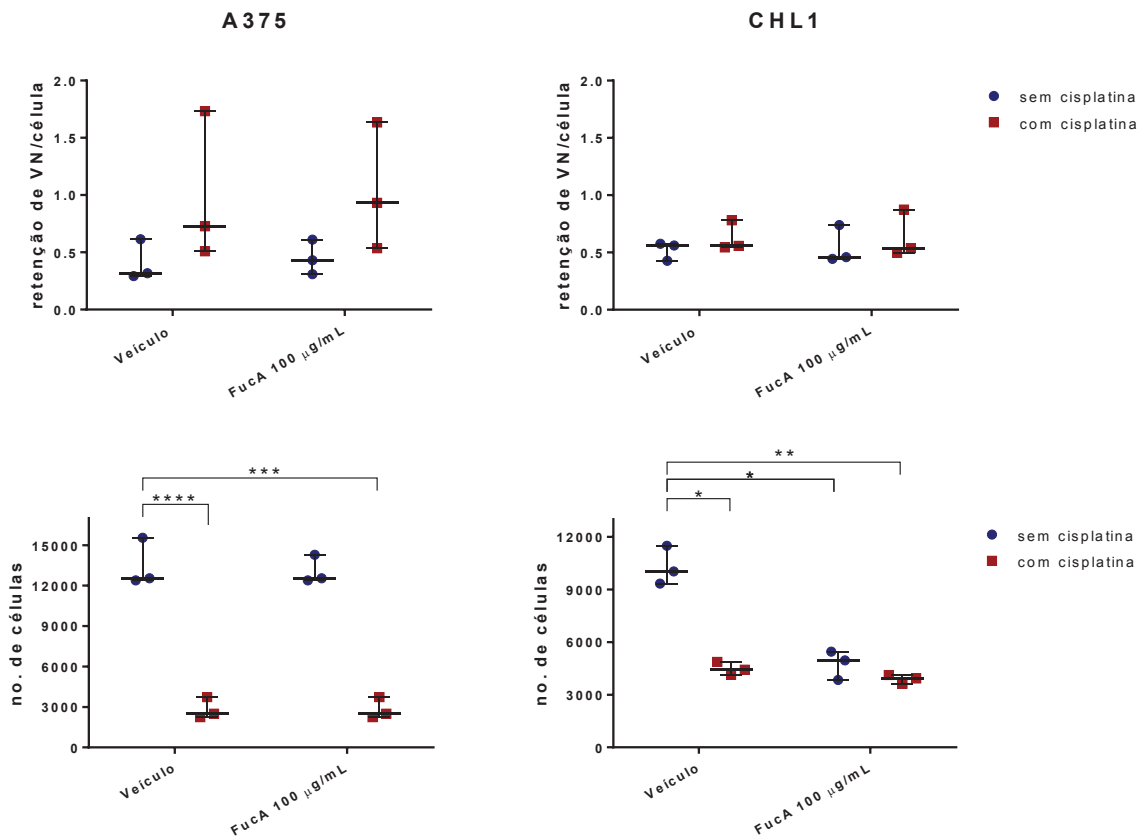
Atualmente ainda existem situações em que o uso de quimioterápicos é a primeira ou segunda escolha de tratamento do paciente com melanoma, como é de se supor para os casos de melanoma triplo negativo, onde os inibidores de proteínas da via MAPK não seriam efetivos. Além disso, alguns estudos encontrados na literatura indicam que outros

polissacarídeos sulfatados ricos em fucose como os aqui estudados apresentam grande potencial para serem utilizados no tratamento combinado à quimioterapia (Ikeguchi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016).

Nesse sentido, após atestada a promissora atividade antiproliferativa da Fucana A, foi realizada uma nova análise de viabilidade e densidade celular, desta vez na presença do quimioterápico Cisplatina, a fim de se verificar um possível efeito sinérgico entre as duas moléculas. Com o mesmo intuito comparativo, a análise foi realizada não só com a linhagem afetada CHL-1, mas também com a linhagem A375. Conforme já relatado, a Dacarbazina é o quimioterápico mais utilizado em tratamentos do melanoma. Apresenta mecanismo de ação semelhante ao da Cisplatina, sendo um alquilante de DNA, porém só se torna ativa após metabolização hepática (Reid *et al.*, 1999). Assim, foi selecionada a Cisplatina para esse teste, uma vez que também é um dos quimioterápicos de escolha para o tratamento de melanoma (NCCN, 2018). A concentração utilizada, de 5 μM , foi baseada em dados da literatura, de estudos que a utilizaram em experimentos *in vitro* (Kozar *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Montopoli *et al.*, 2009; Ottens Vasconcelos *et al.*, 2019). A Figura 13 representa os gráficos resultantes desta análise, onde evidencia-se que a linhagem A375 foi mais sensível ao quimioterápico do que a linhagem CHL-1. Isso pode ter acontecido, muito provavelmente, pelo fato de a linhagem A375 apresentar uma taxa de replicação maior do que a da CHL-1, fazendo com que seu DNA fique mais suscetível à ligação do quimioterápico. Na linhagem CHL-1, embora não tenha sido observado efeito acentuado nos grupos de tratamento combinado, o efeito citostático da Fucana A foi semelhante ao da Cisplatina.

Assim, com esses resultados descrevemos, pela primeira vez, um polissacarídeo sulfatado rico em fucose, extraído de uma alga marrom, que apresentou efeito antiproliferativo comparável ao do quimioterápico Cisplatina, em uma linhagem de melanoma pertencente à classificação genômica triplo-selvagem - para a qual ainda não existem tratamento direcionados - sem causar citotoxicidade em nenhuma das linhagens testadas.

FIGURA 13. EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO DE FUCANA A E CISPLATINA NA VIABILIDADE E DENSIDADE CELULAR DAS LINHAGENS A375 E CHL-1



Fonte: a autora

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade e densidade celular após 72h de tratamento com a Fucana A a 100 µg/mL na presença ou ausência do quimioterápico Cisplatina. Foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicata e expressos em mediana ± range, Teste t pareado. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

4.2.4 Análise do mimetismo vasculogênico em células da linhagem CHL-1 expostas à Fucana A

Em estudo anterior desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa com a Fucana A, em modelo murino *in vivo*, o tratamento preventivo foi capaz de inibir o crescimento tumoral em mais de 30%. No modelo de metástase/colonização pulmonar, reduziu 67% o número de nódulos implantados no pulmão. O tratamento terapêutico com a Fucana A resultou em tumores 50% menores, cuja histologia evidenciou uma redução de 83% da vasculatura tumoral (Bini, 2018). Para o desenvolvimento desse estudo foi utilizada a linhagem B16F10, que é pertencente à classificação triplo negativa, como a CHL-1.

O mimetismo vasculogênico (VM, do inglês *vasculogenic mimicry*) foi descrito pela

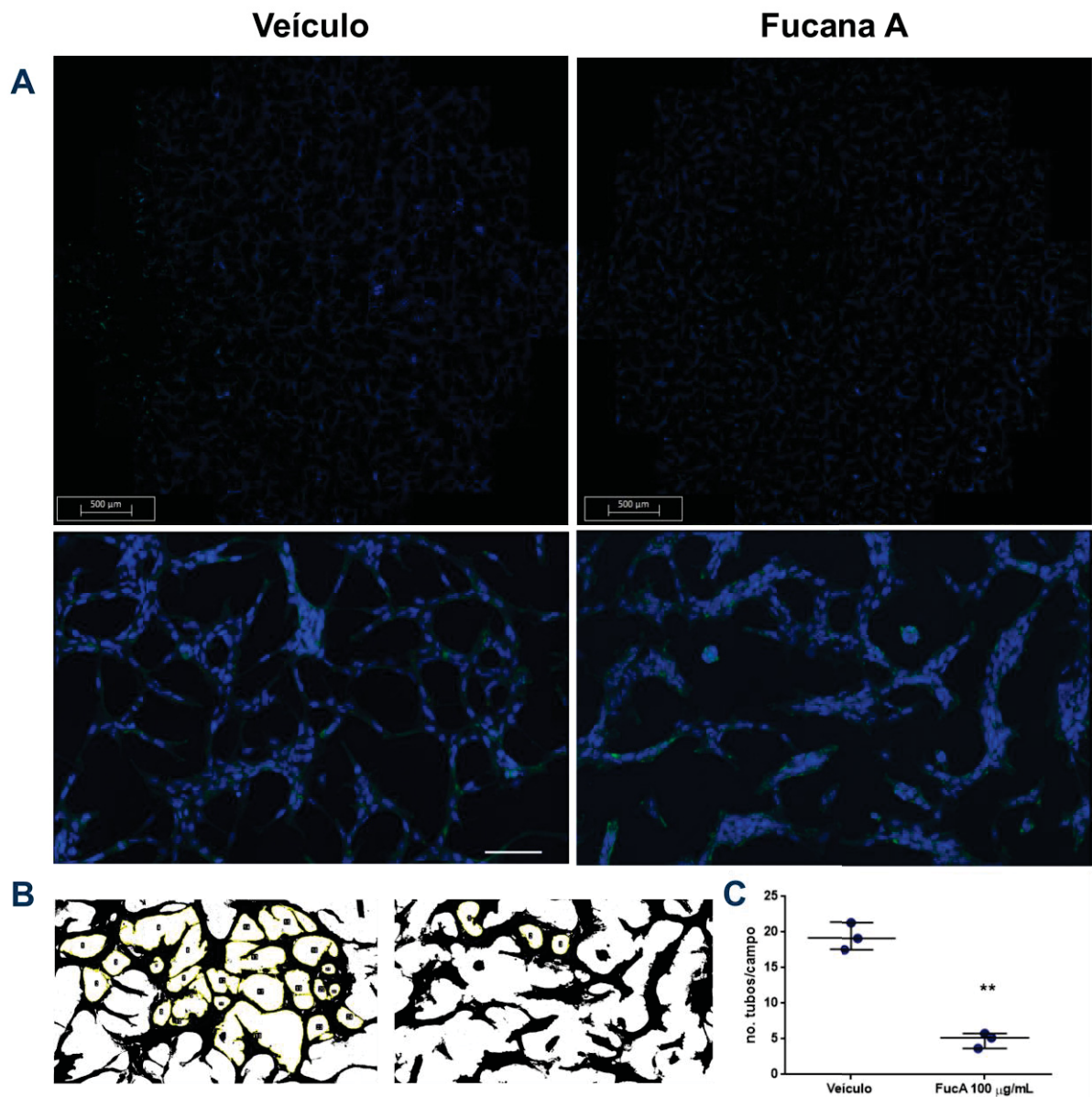
primeira vez em modelo de melanoma por Maniotis e colaboradores (Maniotis *et al.*, 1999). Desde então tem sido relatado em outros diversos tipos de tumores, como carcinomas, sarcomas e glioblastoma (Sun *et al.*, 2004, 2010; Liu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). Os mecanismos moleculares de desencadeamento do VM ainda são pouco esclarecidos (Delgado-Bellido, Serrano-Saenz, Fernández-Cortés e Javier Oliver, 2017), mas estão associados à hipóxia, a fenótipos agressivos e prognóstico desfavorável. Se caracteriza pela formação de canais vasculares revestidos por células tumorais com características de células progenitoras e que expressam genes de células endoteliais (Seftor *et al.*, 2012; Hendrix *et al.*, 2016). Por se tratar de um comportamento relacionado a um prognóstico desfavorável, e à metástase - sendo a vascularização necessária tanto para o crescimento tumoral quanto para a colonização de órgãos distantes - e considerando os resultados *in vivo* anteriormente obtidos (Bini, 2018), era importante que fosse investigado se a Fucana A (100 µg/mL) poderia influenciar nesse comportamento. Para tanto, foi realizado ensaio de formação de vasos, onde o matrigel foi adicionado sobre a monocamada de células da linhagem CHL-1. A seguir, foi adicionado Fucana A, cuja incubação permaneceu por 24h.

O VM, quantificado pelo número de redes vasculares formadas, foi acentuadamente menor no grupo tratado com Fucana A, com redução do número de vasos de 73% (Figura 14). O período de 24h de ensaio, que resultou em formação de vasos no grupo controle, foi estabelecido segundo metodologias descritas na literatura. Vale salientar que o efeito antiproliferativo da Fucana A, descrito anteriormente, não deve ser levado em consideração nesse resultado, já que não houve diferença significativa nas primeiras 24h de exposição.

Como dito anteriormente, os mecanismos detalhados que levam ao VM ainda são obscuros. Mas os poucos estudos existentes encontraram associações com algumas proteínas-chave e suas respectivas vias de sinalização, como a VE-caderina e a EphA2A (Hendrix *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2006). A sequência do estímulo parece ocorrer através da fosforilação de PI3K, FAK e ERK 1/2, que por sua vez aumentam a expressão de metaloproteinases de matriz extracelular, que clivam as lamininas, cujos fragmentos finalmente levam à organização da arquitetura característica do VM (Kirschmann *et al.*, 2012; Hendrix *et al.*, 2016). Além disso, a via desencadeada por VEGFA/VEGFR1 também levou a formação do VM em modelo de melanoma, seguido pela ativação de PI3K/Akt, Src e ERK 1/2 (Vartanian *et al.*, 2011). O VM também foi associado às vias de sinalização HIF1 (fator induzível por hipóxia-1) e Nodal, Notch4 (Kirschmann *et al.*, 2012).

Especificamente relacionado à linhagem CHL-1, estudos recentes mostraram que o bloqueio da desmogleína-2, uma proteína transmembrana da família das caderinas (Tan, Mintoff, Zahied Johan, *et al.*, 2016) e da integrina $\beta 1$ (Kawahara, Niwa e Simizu, 2018), inibiu o VM nessa linhagem celular. No entanto, relacionado às fucanas e fucoidanas, este é o primeiro estudo que investigou o efeito de um polissacarídeo sulfatado na formação do VM. No que diz respeito à atividade antiangiogênica, estudos conduzidos em uma variedade de modelos tumorais, *in vitro* e *in vivo* indicam que fucoidanas modulam a ativação das vias HIF1 e VEGF/VEGFR, por inibir a expressão do VEGF e conseqüentemente de PI3K/Akt (Chen *et al.*, 2015; Teng *et al.*, 2015; Cong *et al.*, 2016; H. Chen *et al.*, 2016). Essa inibição da expressão de VEGF foi evidenciada não só nas células endoteliais, mas também em células tumorais (Xue *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016).

FIGURA 14. EFEITO DA PRESENÇA DA FUCANA A NA FORMAÇÃO DE REDES VASCULARES EM CÉLULAS DA LINHAGEM CHL-1



Fonte: a autora

Legenda: (A) Imagens representativas das redes vasculares formadas durante 24h de incubação com a Fucana A (100 µg/mL). As imagens acima foram obtidas pela "costura" de múltiplas imagens obtidas no Scanner de lâminas Histológico (VSlide) de toda a área das lamínulas (acima), de onde foram quantificados os tubos formados em 10 campos (abaixo) selecionados aleatoriamente e a seguir (B) transformados em imagens binárias, para facilitar a quantificação (C). Foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicata e expressos em mediana \pm range, Teste t pareado. ** $p < 0,01$

4.2.5 Análise de expressão de moléculas de adesão e matriz extracelular por células da linhagem CHL-1

Salientando e correlacionando os resultados mais expressivos do presente estudo (inibição da proliferação e do VM), a matriz extracelular (MEC) é capaz de influenciar a proliferação celular através de vários mecanismos, como seu remodelamento; e a liberação de fatores de crescimento aprisionados em suas moléculas, através da degradação das mesmas (Lu *et al.*, 2011). Já o mimetismo vasculogênico é evidenciado em regiões de grande deposição de MEC, e os estudos de fato sugerem que a plasticidade tumoral necessária para a formação do VM advém das interações com o meio extracelular, incluindo a MEC (Kawahara, Niwa e Simizu, 2018).

Assim, para avaliar o efeito da Fucana A (72h, 100 µg/mL) na expressão de moléculas de adesão celular e de matriz extracelular em células da linhagem CHL-1 - onde o polissacarídeo alterou a proliferação e VM - foi realizado ensaio de expressão gênica por PCR em Tempo Real (RT-qPCR). Para isso, foi utilizada a placa RT² Profiler PCR Array, que possibilita análise de um painel de 84 genes que codificam para proteínas de adesão e de matriz extracelular. Os genes diferencialmente expressos encontrados estão listados Tabela 3; e os dados totais estão descritos no Anexo 1 (Cts). A análise estatística da quantificação relativa (teste t pareado com os valores de ΔCt) das amostras não resultou em valores de p menor do que 0,05. Esse fato pode ser justificado pelo viés experimental, uma vez que cada experimento independente deve ser executado em placas diferentes e em dias diferentes, o que o torna predisposto a variâncias (Taylor, Laperriere e Germain, 2017). Porém a curva de dissociação, que permite verificar a especificidade do produto amplificado ao final de cada reação, demonstrou que não houve amplificações inespecíficas, formação de dímeros de primers ou contaminação das amostras. Ainda assim, para tornar o resultado mais robusto, foram excluídos genes diferencialmente expressos que apresentaram baixa quantificação de ácidos nucleicos ($Ct > 30$; (Karlen *et al.*, 2007)) e/ou grandes variâncias interexperimentais (+ de 3 ciclos) em apenas um dos grupos.

TABELA 3. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA LINHAGEM CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A

Gene	Descrição	Fold regulation
COL11A1	<i>Collagen, type XI, alpha 1</i>	-1.61
COL6A2	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>	-2.02
COL8A1	<i>Collagen, type VIII, alpha 1</i>	-1.61
CTNNB1	<i>Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>	-2.54
ECM1	<i>Extracellular matrix protein 1</i>	-1.59
ITGA4	<i>Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)</i>	-1.60
ITGB3	<i>Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)</i>	-1.61
TGFBI	<i>Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa</i>	-2.02
VCAN	<i>Versicam</i>	-2.00
CD44	<i>CD44 molecule (Indian blood group)</i>	1.60
COL15A1	<i>Collagen, type XV, alpha 1</i>	1.60
COL16A1	<i>Collagen, type XVI, alpha 1</i>	3.22
HAS1	<i>Hyaluronan synthase 1</i>	1.60
ITGA1	<i>Integrin, alpha 1</i>	1.59
ITGB4	<i>Integrin, beta 4</i>	2.01
SELE	<i>Selectin E</i>	1.61

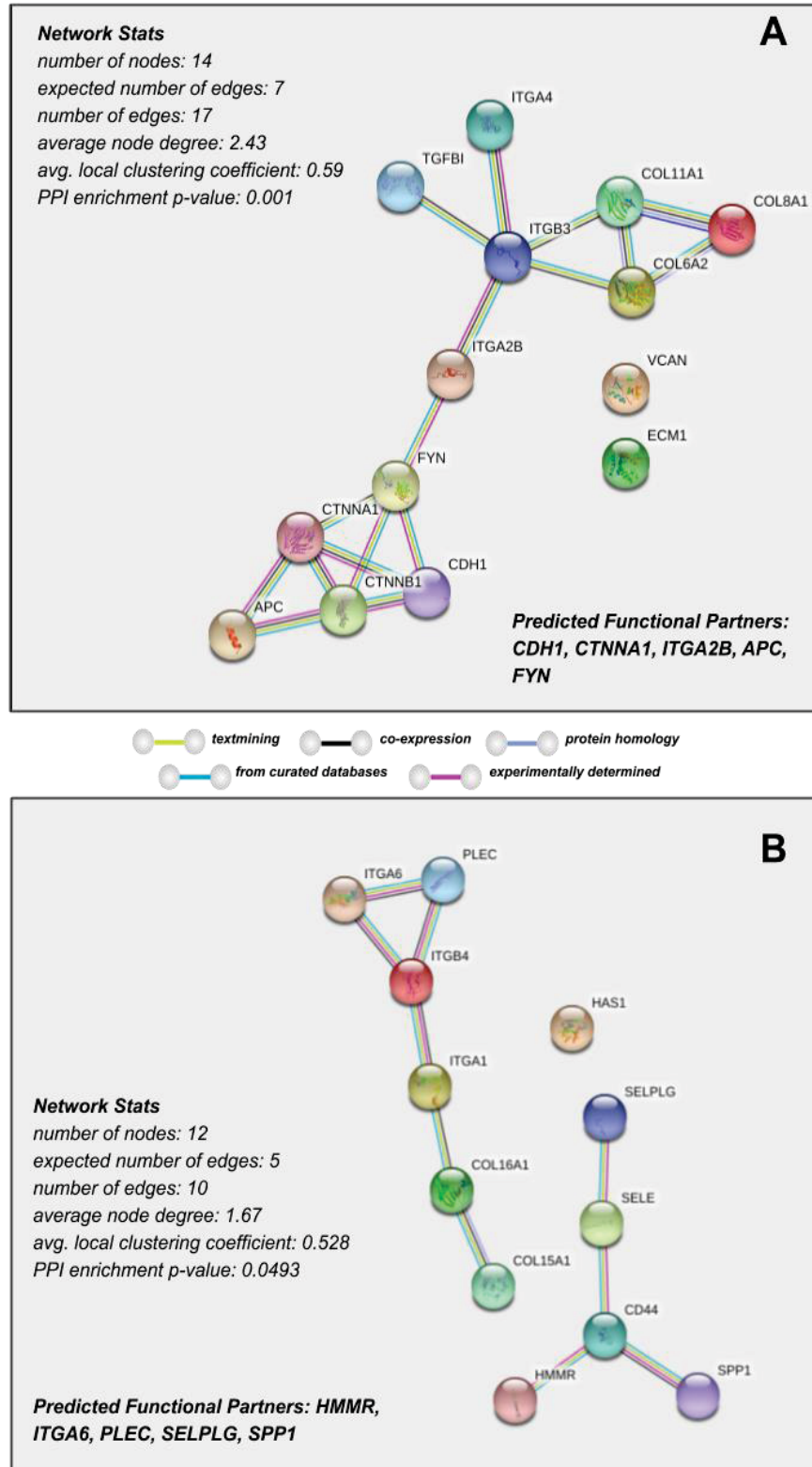
Fonte: a autora

Legenda: cor de fundo em lilás refere-se aos genes cuja expressão foi diminuída e em azul os genes cuja expressão aumentou após tratamento com a Fucana A.

Os dados da tabela acima foram submetidos à análise bioinformática através da ferramenta STRING (do inglês *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*), que permite a construção de redes de interação proteína-proteína (PPI, do inglês *protein-protein interaction*), para a predição de possíveis interações e vias de sinalização relacionadas aos dados de entrada. As PPIs foram construídas com a predição de até cinco primeiros vizinhos e definindo-se as fontes de interação ativas: dados

experimentais, bancos de dados, coexpressão, coocorrência, vizinhança genômica e mineração de dados da literatura. As linhas coloridas que conectam as proteínas representam o tipo de evidência de interação, e foram estabelecidas com o maior escore de confiança (0,900). As duas PPIs geradas, uma com os genes cuja expressão foi diminuída e outra com os genes superexpressos na linhagem CHL-1 após tratamento com a Fucana A podem ser visualizadas na Figura 15, das quais foram obtidas ainda análises de enriquecimento dos bancos de dados Gene Ontology (GO), Reactome pathway e Kyoto Encyclopedia Gene and Genomes (KEGG) pathway (Anexo 2). Nessas análises, como esperado, ambos os grupos de genes diferencialmente expressos foram relacionados a termos como 'organização da matriz extracelular' (GO:0030198) e 'adesão celular' (GO:0007155). Para citar alguns enriquecimentos do grupo com expressão aumentada, os genes *CD44*, *ITGA1*, *ITGB4* foram associados ao termo 'adesão célula-matriz extracelular' (GO:0007160); *COL16A1*, *ITGA1*, *ITGB4* a 'via de sinalização mediada por integrina' (GO:0007229); *CD44*, *SELE* a 'adesão célula-célula' (GO:0007159); *CD44* a 'processos catabólicos do ácido hialurônico' (GO:0030214), 'processos metabólicos do ácido hialurônico' (GO:0030212) e 'captura e degradação do ácido hialurônico' (HSA-2160916). Já do grupo de genes cujo tratamento com a Fucana A diminui a expressão foram revelados alguns enriquecimentos próprios que corroboram fortemente com os resultados discutidos anteriormente. *COL8A1*, *CTNNB1*, *ECM1*, *ITGB3*, *TGFBI* foram associados ao termo 'angiogenesis' (GO:0001525); *ITGB3* a 'via de sinalização do fator de crescimento endotelial vascular' (GO:0048010); *CTNNB1*, *ITGB3* a 'via VEGFA-VEGFR2' (HSA-4420097); *CTNNB1*, *ECM1*, *ITGA4*, *ITGB3* a 'regulação da proliferação celular' (GO:0042127); e *COL8A1*, *CTNNB1*, *TGFBI* to 'proliferação de população celular' (GO:0008283).

FIGURA 15. INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA CONSTRUÍDA A PARTIR DOS RESPECTIVOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA LINHAGEM CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A



Fonte: a autora

Legenda: (A) PPI referente aos genes cujo tratamento com a Fucana A diminuiu a expressão.
 (B) PPI referente aos genes cujo tratamento com a Fucana A aumentou a expressão.

4.2.6 Análise de expressão de β -catenina e Ki-67

CTNNB1, o gene mais citado nessas análises de enriquecimento, codifica para β -catenina, uma proteína essencial nas junções aderentes (hsa04520) e na via de sinalização Wnt canônica (hsa04310) (Bienz, 2005). Nas junções aderentes, o tipo mais comum de adesão célula-célula, a β -catenina atua como uma proteína adaptadora, juntamente com a α -catenina (codificada por *CTNNA1*), intermediando a conexão do citoesqueleto de actina com as caderinas (codificada por *CDH1*). A β -catenina pode ser fosforilada por tirosina-quinases citoplasmáticas, como Fyn (codificado por *FYN*), causando a dissociação do complexo caderina-catenina (Valenta, Hausmann e Basler, 2012). Sem sinalização externa para o estímulo da via Wnt, a β -catenina citoplasmática livre é marcada para degradação proteossomal, por um complexo de destruição composto por, entre outras moléculas, axina, *APC* (do inglês *adenomatous polyposis coli*) e GSK3 β (glicogênio sintase quinase 3 beta). Mediante estímulo extracelular, o complexo de destruição é inibido, e a β -catenina é translocada para o núcleo, onde ativa a transcrição dos genes alvo de Wnt, como a ciclina D1 (Vlad-Fiegen *et al.*, 2012).

A via Wnt canônica ou Wnt/ β -catenina é uma via de sinalização evolutivamente conservada, correlacionada à progressão tumoral em diversos tipos de câncer (Galluzzi *et al.*, 2019; M. Wang *et al.*, 2019). De fato, a análise KEGG associou *CTNNB1* a 'vias de sinalização do câncer' (hsa05200), 'de endometrio' (hsa05213), 'gástrico' (hsa05226), 'de tireóide' (hsa05216) e 'de bexiga' (hsa05219). A família de genes Wnt também está associada ao desenvolvimento da crista neural, durante a diferenciação dos melanócitos em várias espécies (Palmieri *et al.*, 2009). Porém, com relação à progressão do melanoma, a literatura aponta sinais contraditórios para essa via de sinalização (Zhan, Rindtorff e Boutros, 2017). Em alguns estudos translacionais e clínicos, β -catenina nuclear elevada foi relacionada a melhores taxas de sobrevivência e uma doença menos agressiva (Kageshita *et al.*, 2001). No entanto, em outros estudos, foi implicado na patogênese do melanoma (Kovacs *et al.*, 2016). Em cultivos celulares, a perda de sinalização de β -catenina foi relacionada à desativação de fibroblastos associados ao tumor, à diminuição do crescimento e a interrupção da progressão do melanoma (Zhou, Yang, Randall Wickett, *et al.*, 2016). A β -catenina também foi capaz de inibir a apoptose e estimular a proliferação, migração e invasão de células de melanoma (Sinnberg *et al.*, 2011).

Para confirmar a menor expressão de β -catenina em células da linhagem CHL-1

após tratamento com a Fucana A, foram realizadas análises por imunofluorescência e visualização em microscopia confocal, juntamente com o marcador de proliferação Ki-67. Na Figura 16 é possível evidenciar uma menor expressão de ambas as proteínas, quando comparadas ao grupo veículo. Outra observação clara é que a β -catenina se localiza principalmente nas membranas celulares e no citoplasma, mas não no núcleo. Esse fato sugere que, nessa linhagem, a β -catenina deve ter maior participação nas junções aderentes do que na via Wnt. Outra sugestão é de que essa linhagem tem característica pouco invasiva, uma vez que a β -catenina perde afinidade de ligação nas junções aderentes quando ocorre a transição epitélio mesênquima e as células passam a expressar N-caderina ao invés de E-caderina, sendo esse, portanto, um indicador de adesão celular normal (Heuberger e Birchmeier, 2010; Gurzu, Beleaua e Jung, 2018). Como demonstrado pela análise morfológica (Figura 9), não foram observadas diferenças na adesão celular entre os grupos controle e tratado. Esses fatos sugerem que a diminuição da expressão de β -catenina pelo tratamento com a Fucana A poderia estar influenciando a proliferação de células CHL-1 através de modulações em outras vias de sinalização que não a via Wnt canônica.

A β -catenina também foi relacionada à 'regulação positiva da sinalização de I-kappaB quinase/NF-kappaB' (GO: 0043123). A via de sinalização NF- κ B é ativada em resposta a vários estímulos biológicos e sinais de estresse, conseqüentemente, afeta várias características do câncer através da ativação transcricional de genes associados à proliferação celular, angiogênese, metástase, progressão tumoral, inflamação e inibição da apoptose (Rozzo *et al.*, 2013). As proteínas NF- κ B são normalmente sequestradas no citoplasma por seu inibidor I κ B. Do contrário, quando a via é ativada, o I κ B é fosforilado e a seguir degradado pelo proteossoma 26S, permitindo que os dímeros de NF- κ B sejam translocados para o núcleo e iniciem a transcrição de proteínas relevantes para a progressão do câncer, como citocinas, quimiocinas, ciclina D1, metaloproteinases da matriz extracelular, e proteínas antiapoptóticas (Amiri e Richmond, 2005; Amschler *et al.*, 2010).

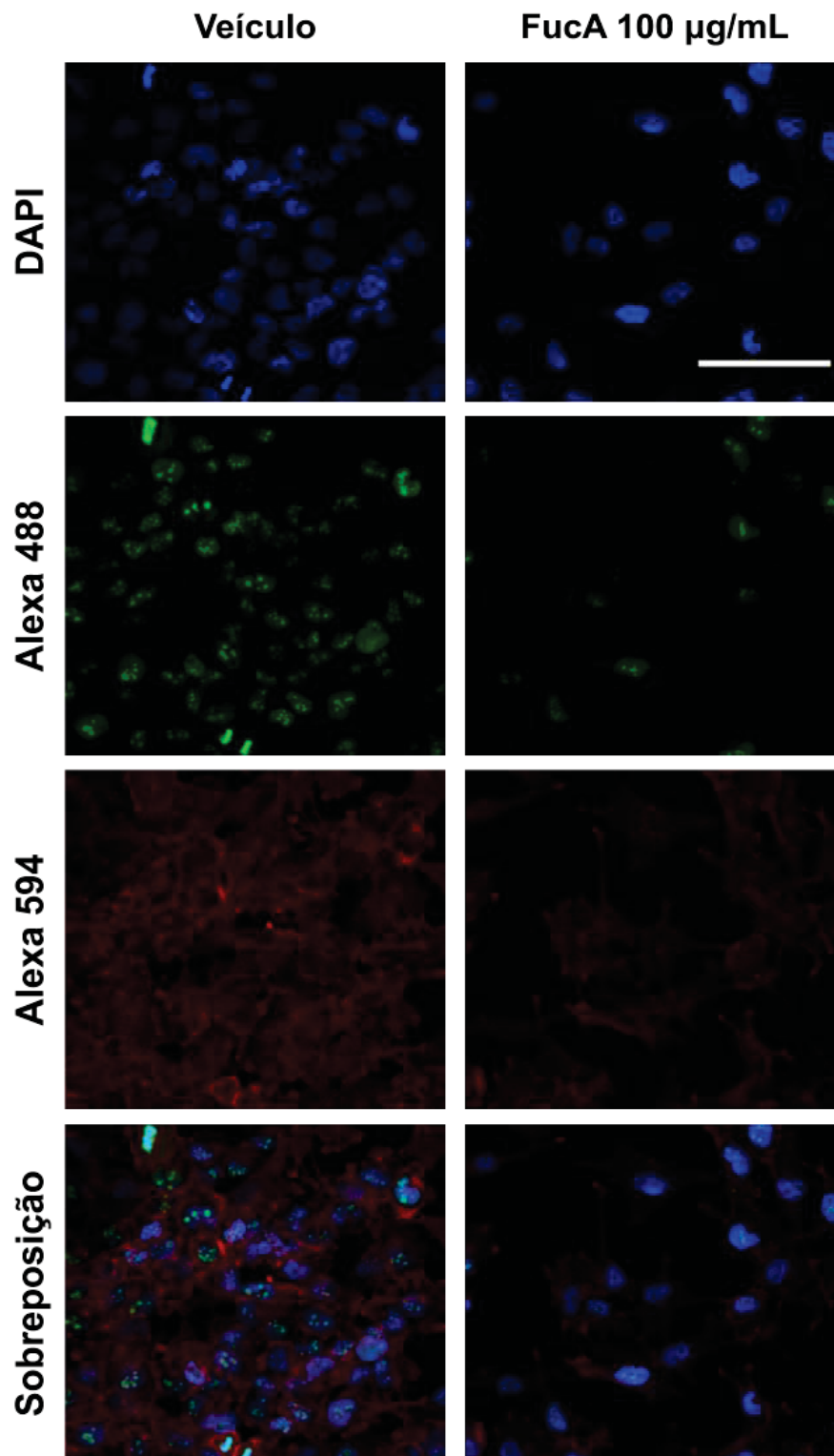
A ativação constitutiva de NF- κ B está associada a vários tipos de tumores malignos, incluindo melanoma (Brücher *et al.*, 2019), onde foi demonstrado que a superexpressão de NF- κ B se correlaciona com a progressão tumoral e potencial metastático (Amiri e Richmond, 2005; Janjetovic *et al.*, 2011; Madonna *et al.*, 2012).

Estudos *in vitro* mostraram NF- κ B nuclear constitutivamente ativado em linhagens de melanoma humano em comparação com melanócitos normais (McNulty *et al.*, 2004;

Ueda e Richmond, 2006), devido a mecanismos como o aumento da degradação proteolítica de I κ B (Liu *et al.*, 2007) e a incapacidade de ligação do dímero de NF- κ B RelA à p16INK4a mutada (Becker *et al.*, 2005). A p16INK4a é uma das duas proteínas inibidoras de CDK codificadas por *CDKN2A*, um dos genes mutados da linhagem CHL-1. A p16INK4a se liga às quinases dependentes de ciclina (CDKs) 4 e 6 e inibe a fosforilação da proteína Rb, impedindo, assim, a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (Serrano, Hannon e Beach, 1993). Além disso, outros estudos sugerem fortemente que a ativação de NF- κ B pode ser desencadeada por outras vias de sinalização, como MAPK e PI3K/Akt. A fosforilação de Akt foi relacionada à degradação de I κ B (Das, Philip, G. Mahabeleshwar, *et al.*, 2005) e à regulação positiva de p38-MAPK induzida por β -catenina, que por sua vez causa a ativação de NF κ B (Kuphal *et al.*, 2004). No melanoma a estimulação de Akt e p38 MAPK também foi relacionada ao VM (Vartanian *et al.*, 2011).

De fato, inúmeros estudos conduzidos em diversos tipos de modelos tumorais também evidenciaram a atividade antiproliferativa de outras fucanas e fucoidanas, por interrupção do ciclo celular na fase G1 (Min *et al.*, 2014; Han, Lee e Lee, 2015); inativação das vias NF- κ B (Haneji *et al.*, 2005; Cho, Kim e Moon, 2014) e PI3K/Akt (Boo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Choo *et al.*, 2016), via expressão de PTEN (S.-Y. Wu *et al.*, 2016; Kim e Nam, 2018) e expressão de p21 (Cho, Kim e Moon, 2014; Park *et al.*, 2014; Atashrazm, R. Lowenthal, *et al.*, 2015; Han, Lee e Lee, 2015); diminuição na expressão de CDK2, CDK4, ciclina D1 e ciclina E (Park *et al.*, 2015); inibição de ERK1/2 e p38 (Che *et al.*, 2013; H. Park *et al.*, 2013). A modulação evidenciada nesses estudos não teve relação com p53, porém vale salientar que a linhagem CHL-1 apresenta mutação em *TP53*, além de *CDKN2A*, e que esta mutação é a mais comum em todos os tipos de melanoma. Assim, as mutações presentes na linhagem CHL-1 sugerem desregulação do controle do ciclo celular, que aparentemente foi restaurado pela Fucana A.

FIGURA 16. DETECÇÃO DE β -CATENINA E Ki-67 EM CÉLULAS DA LINHAGEM CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A



Fonte: a autora

Legenda: Imagens representativas da detecção, por imunomarcção e visualização em microscopia de varredura a laser confocal da expresso das proteínas β -catenica (Alexa 594) e Ki-67 (Alexa 488), após 72h de tratamento com a Fucana A (100 $\mu\text{g/mL}$). Núcleos estão marcados em azul (DAPI). Legenda: FucA = Fucana A; Barra de escala = 100 μm

4.2.7 Análise de interação Fucana A - CD44

As análises de expressão gênica também evidenciaram aumento da expressão de CD44 (*CD44*) e hialuronam-sintase (*HAS*). A hialuronam-sintase é a enzima responsável pela síntese do ácido hialurônico, o polissacarídeo mais abundante da matriz extracelular e que desempenha inúmeras funções biológicas, como manutenção da homeostase tecidual, a lubrificação dos fluidos corporais e a cicatrização (Siiskonen *et al.*, 2015). Funções que o tornaram tão requisitado nos produtos cosméticos.

Outro papel importante desempenhado pelo polissacarídeo é o estímulo para proliferação celular, desencadeado pela sua interação com o receptor CD44. Em células de melanoma humano foi observado que a presença de ácido hialurônico causou aumento da proliferação de forma dose-dependente e mediada por CD44, sendo esse, portanto, considerado o principal receptor de ligação do polissacarídeo (Ahrens, Assmann, *et al.*, 2001). Tal ligação desencadeia mudanças conformacionais que aumentam a interação entre proteínas adaptadoras e do citoesqueleto aos domínios intracelulares que por sua vez ativam vias de sinalização relacionadas a proliferação, adesão, migração e invasão (Ahrens, Sleeman, *et al.*, 2001; Zöllner, 2011; Nam *et al.*, 2015), como as vias MAPK e PI3K/Akt (Lv *et al.*, 2016).

O versicam, outra proteína cuja expressão foi modulada (nesse caso diminuída) pelo tratamento das células CHL-1 com a Fucana A, é um proteoglicano de condroitim sulfato que se liga ao ácido hialurônico, criando assim agregados do polissacarídeo (LeBaron, Zimmermann e Ruoslahti, 1992; Chen *et al.*, 2018). Em estudos com células de melanoma humano, silenciamento/inibição de versicam e CD44 causaram diminuição da proliferação e migração celular (Hernández *et al.*, 2011; Yang, Bu e Li, 2017). Em outro estudo, com diversas linhagens de melanoma, o versicam foi relacionado à progressão tumoral, uma vez que foi capaz de estimular a proliferação e inibir a adesão à fibronectina e ao colágeno tipo I. Além disso, foi encontrada uma maior expressão da molécula em linhagens de tumor primário e de metástases e uma baixa expressão em linhagens de nevos melanocíticos (Touab *et al.*, 2002).

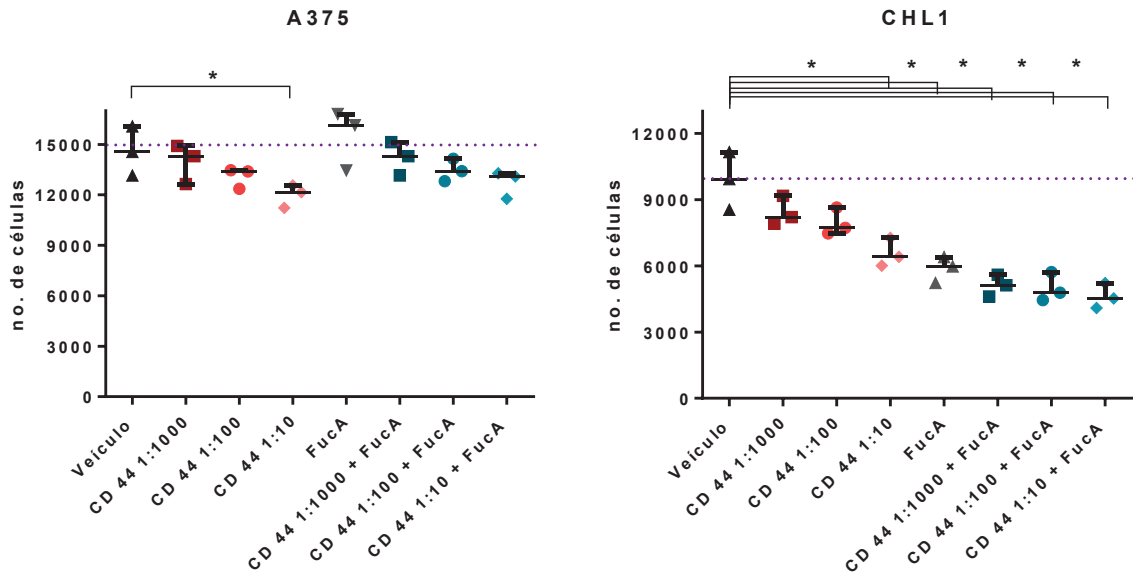
Estruturalmente, o ácido hialurônico e a Fucana A são moléculas bem distintas, porém compartilham uma similaridade química, que é a presença de ácido-D-glucurônico em sua composição, o que também faz com que ambas moléculas possuam carga negativa. A Fucana A é uma xilofucoglucoronana com cadeia principal de unidades de

ácido-D-glucurônico β -(1 \rightarrow 3) ligadas e cadeia lateral de trissacarídeos de fucose α -(1 \rightarrow 3) ligados, que pode ter substituições de grupamento sulfato e/ou dissacarídeos de xilose β -(1 \rightarrow 4) ligados, que por sua vez também podem estar sulfatados. O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano de cadeia linear composta de unidades de dissacarídeos formados por ácido-D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina (Chen *et al.*, 2018).

Assim, considerou-se a relação dessas proteínas, CD44, hialuronam sintase e versicam, cujos genes foram diferencialmente expressos, com a proliferação celular. Considerou-se também a discreta, porém plausível similaridade molecular dos polissacarídeos Fucana A e ácido hialurônico, o que poderia determinar epítomos estruturais semelhantes, fazendo com que a Fucana A fosse capaz de se ligar ao receptor CD44 e impedir a interação do mesmo com seu ligante original e assim bloquear a ativação de vias de sinalização. O aumento da expressão de CD44 e HAS poderia estar relacionado a algum processo de *feedback* positivo, relacionado ao mecanismo de ação da Fucana A.

Para investigar essa hipótese foi realizada análise de densidade celular após ensaio de competição do anticorpo anti-CD44 (3 concentrações) com a Fucana A (100 μ g/mL), incubados por 72 h em cultivos celulares das linhagens A375 e CHL-1, para se comparar as respostas obtidas entre as duas linhagens com perfis diferentes frente ao parâmetro proliferação. Os resultados apresentados na Figura 17, mostram que o anticorpo anti-CD44 realmente tem a capacidade de inibir a proliferação de forma concentração-dependente. Além disso, observa-se que na linhagem A375 a presença da Fucana A e anti-CD44 não alterou a densidade celular, em nenhuma das concentrações do anticorpo testadas. Já na linhagem CHL-1 é possível observar que a presença da Fucana A sozinha foi capaz de inibir a proliferação tão eficientemente quanto a maior concentração do anti-CD44, e que a incubação das duas moléculas conjuntamente resultou em densidade celular semelhante à da Fucana A sozinha, em todas as concentrações de anticorpo testadas. Esse fato pode significar, basicamente, que a Fucana A realmente se liga ao CD44, ou que seu efeito citostático é tão pronunciado que camufla a atividade decorrente da interação CD44-ácido hialurônico.

FIGURA 17. EFEITO DA PRESENÇA DA FUCANA A NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS LINHAGENS A375 E CHL-1 DESENCADEADA VIA CD44



Fonte: a autora

Legenda: Representação gráfica dos resultados obtidos na análise de densidade celular após ensaio de competição Fucana A e anticorpo anti-CD44. FucaA = Fucana A a 100 µg/mL. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e expressos em mediana ± range. Teste t pareado. *p<0,05.

4.2.8 Localização da ligação da Fucana A

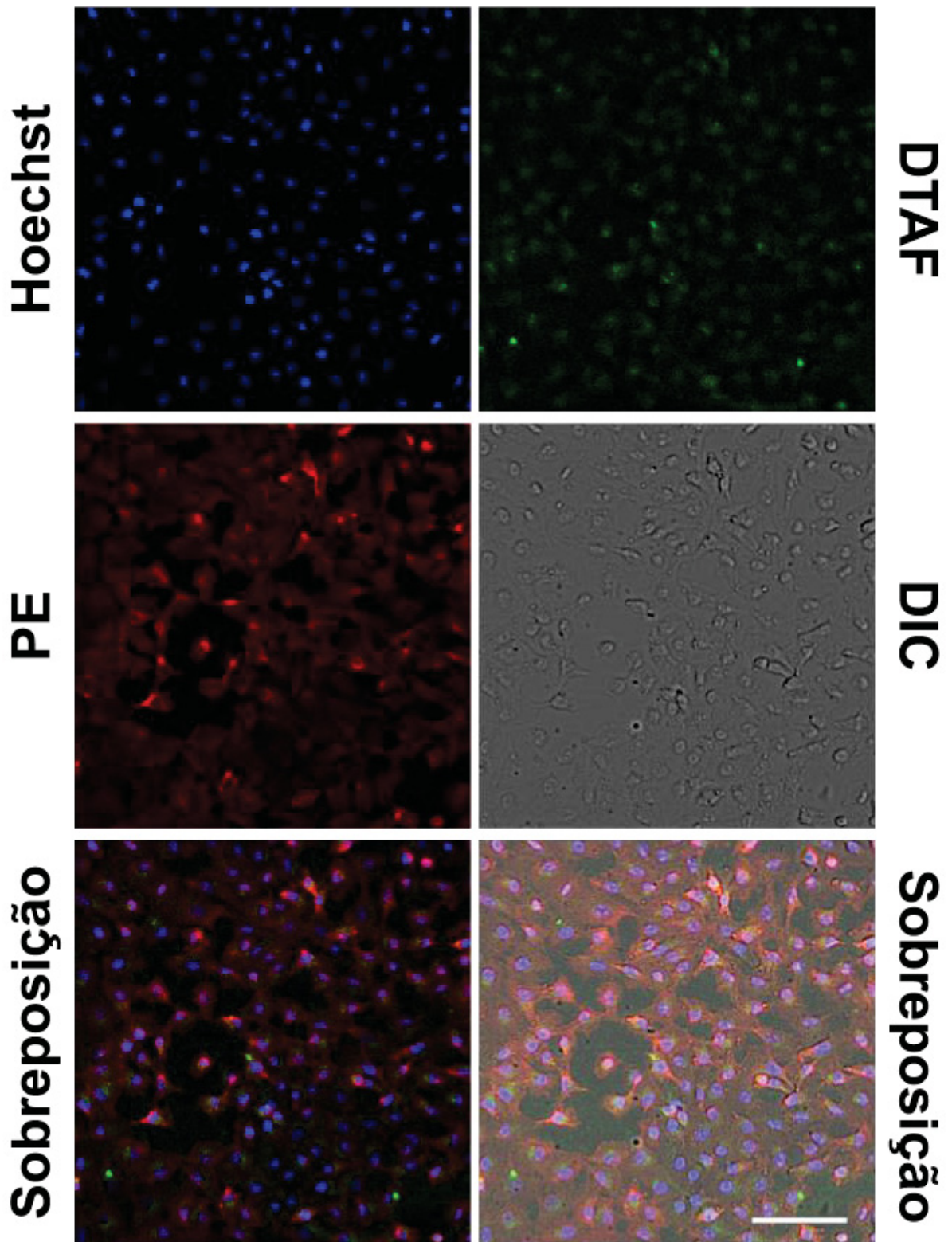
O ensaio de competição acima descrito reafirmou a possibilidade de a Fucana A interagir ativamente com o receptor CD44. Para continuar essa investigação, foi realizada análise de detecção citoquímica da Fucana A e imunomarcagem do receptor CD44, para avaliar se havia, ou não, interação e consequente colocalização. Para isso, células das linhagens A375 e CHL-1 foram incubadas por 24h com a Fucana A (100 µg/mL) conjugada ao fluoróforo DTAF. Ao final dos períodos de exposição foram adicionados ao meio de cultivo o fluoróforo Hoescht, para marcar o núcleo, e o anticorpo anti-CD44 conjugado ao fluoróforo PE. As lâminas foram montadas e analisadas por microscopia de varredura a laser confocal. Mesmo que a hipótese fosse refutada, a marcação da molécula poderia trazer respostas sobre os mecanismos de ação das atividades biológicas apresentadas.

Nas imagens obtidas após 24h, embora a marcação tenha ficado fraca, é possível observar que há indícios de internalização da Fucana A conjugada ao fluoróforo na linhagem A375 (Figura 18); e na linhagem CHL-1 a marcação sugere estar presente na

membrana das células (Figura 19).

Estudos encontrados na literatura já observaram a internalização e de outros polissacarídeos sulfatados ricos em fucose (Deux *et al.*, 2002; Zhurishkina *et al.*, 2020). Em um estudo que analisou a atividade biológica de diferentes extratos de polissacarídeos sulfatados ricos em fucose foi mostrado que dois deles eram internalizados, porém apenas um deles apresentou atividade biológica seletiva. A mesma concentração do polissacarídeo denominado FE2 causou apoptose nas linhagens tumorais (adenocarcinomas de mama MCF-7 e MDA-MB-231) sem alterar a viabilidade das células das linhagens normais (endoteliais HPMEC-ST1.6R e fibroblastos MRC-5) (Oliveira *et al.*, 2017). O FE2 não foi internalizado pelas células endoteliais. Em outro estudo foi demonstrado que a Fucana B, outro polissacarídeo rico em fucose da alga *Spatoglossum schröderi* composta de galactose, fucose, xilose e grupamentos sulfato (1: 2: 0.5: 2), não é internalizada, se liga à fibronectina na matriz extracelular e inibe a formação de vasos em células endoteliais de aorta de coelho (Menezes *et al.*, 2018). Em conjunto esses dados sugerem que a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados ricos em fucose não é dependente da internalização dos mesmos.

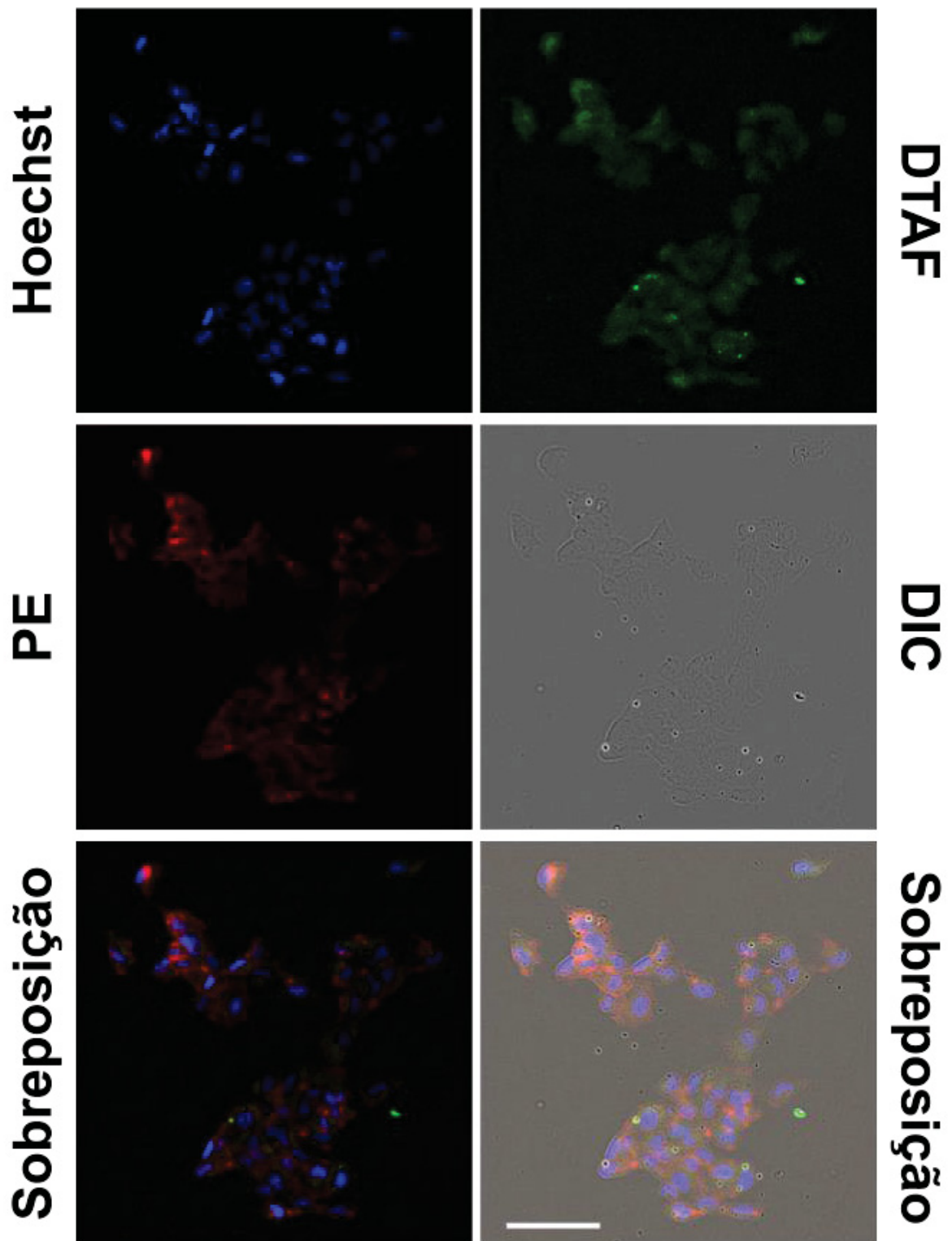
FIGURA 18. RASTREAMENTO DA FUCANA A NA LINHAGEM A375



Fonte: a autora

Legenda: Imagens representativas da imunodeteção da proteína CD44 (PE, vermelho) e detecção citoquímica da Fucana A (conjugada com DTAF, verde) após incubação por 24h. Núcleos estão marcados em azul (Hoechst). Barra de escala = 100 μ m

FIGURA 19. RASTREAMENTO DA FUCANA A NA LINHAGEM CHL-1



Fonte: a autora

Legenda: Imagens representativas da imunodeteção da proteína CD44 (PE, vermelho) e detecção citoquímica da Fucana A (conjugada com DTAF, verde) após incubação por 24h. Núcleos estão marcados em azul (Hoechst). Barra de escala = 100 μ m

4.3 Avaliação do efeito dos polissacarídeos sobre fenótipos tumorais relacionados à metástase

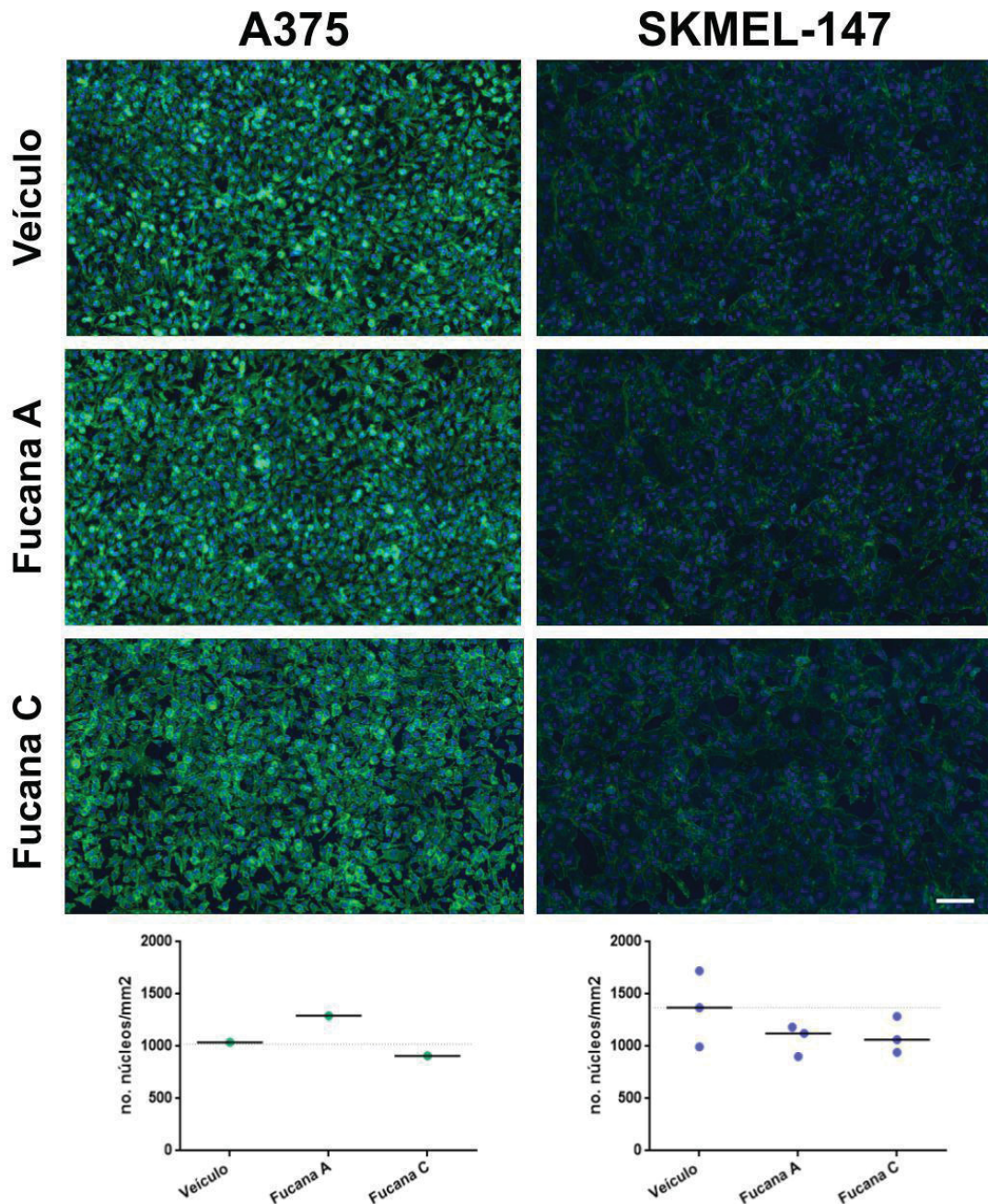
Os dados apresentados até aqui mostram, de forma clara, que a Fucana A tem efeito sobre a linhagem de melanoma triplo selvagem. No entanto, com o intuito de aprofundar o estudo sobre o efeito das Fucanas A e C de *Spatoglossum schröderi*, os próximos passos foram realizados com o objetivo de entender se esses polissacarídeos são capazes de modular fenótipos tumorais característicos do processo metastático.

Para a deflagração do processo metastático as células devem ser capazes de degradar a membrana basal para assim invadir e migrar para os tecidos adjacentes. Assim, dando continuidade à investigação do efeito dos polissacarídeos sobre fenótipos tumorais, foram realizadas análises de invasão e migração celular. Como discutido no item anterior, existem fucoidanas que podem ser internalizadas, porém também existem indícios na literatura de que essas moléculas se ligam a componentes da matriz extracelular (Liu *et al.*, 2005; Menezes *et al.*, 2018). Dessa forma, no delineamento experimental determinou-se que esses ensaios fossem executados com as células pré-tratadas, com o intuito de se averiguar o efeito dos polissacarídeos sem o viés de uma interação dos mesmos com a matriz extracelular ou com o matrigel. Com base nos dados da análise de densidade celular, também determinou-se que esses ensaios fossem realizados apenas com as linhagens A375 e SKMEL-147, uma vez que a inibição da proliferação da linhagem CHL-1 exercida pela Fucana A poderia interferir nos resultados. Além disso, apesar de divergências na taxa proliferativa, as duas linhagens selecionadas apresentam mutações que afetam a mesma via de sinalização (MAPK) e apresentam fenótipo metastático (*Cell lines by genetic mutation*, no date; Alla *et al.*, 2010; Massaro *et al.*, 2017).

Os dados abaixo apresentados (Figuras 20, 21 e 22) são resultados preliminares, uma vez que ainda não foram executados pelo menos três experimentos de cada ensaio. Porém, analisados conjuntamente sugerem um efeito modulador, principalmente do polissacarídeo Fucana C, frente a esses fenótipos tumorais, invasão e migração celular. Nas replicatas técnicas analisadas é possível observar que tanto o número de células invasivas, como a área de migração diminuíram em ambas linhagens pré-tratadas com a Fucana C; e que ambos os polissacarídeos afetaram tanto invasão quanto migração celular da linhagem SKMEL-147, conhecidamente metastática. Vale salientar que esses

resultados prévios corroboram com os resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, em modelo de melanoma murino, onde ambos os polissacarídeos também reduziram invasão e migração celular da linhagem murina B16F10 (Santi, 2015).

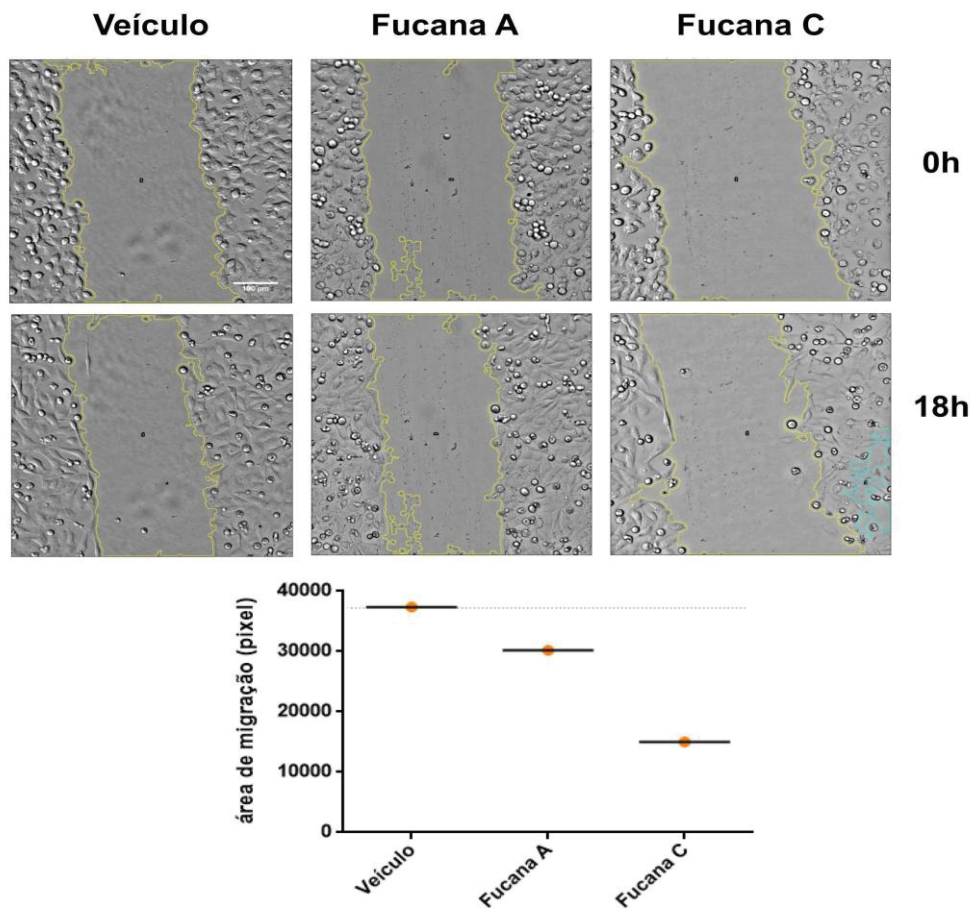
FIGURA 20. EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA CAPACIDADE INVASIVA DAS LINHAGENS A375 E SKMEL-147



Fonte: a autora

Legenda: Imagens representativas das células invasivas pré-tratadas com os polissacarídeos a 100 µg/mL por 72h. Núcleos estão marcados em azul e o citoesqueleto de actina em verde. Foi realizado 1 experimento com a linhagem A375 e 3 experimentos independentes com a linhagem SKMEL-147, em duplicata. Barra de escala = 100 µm

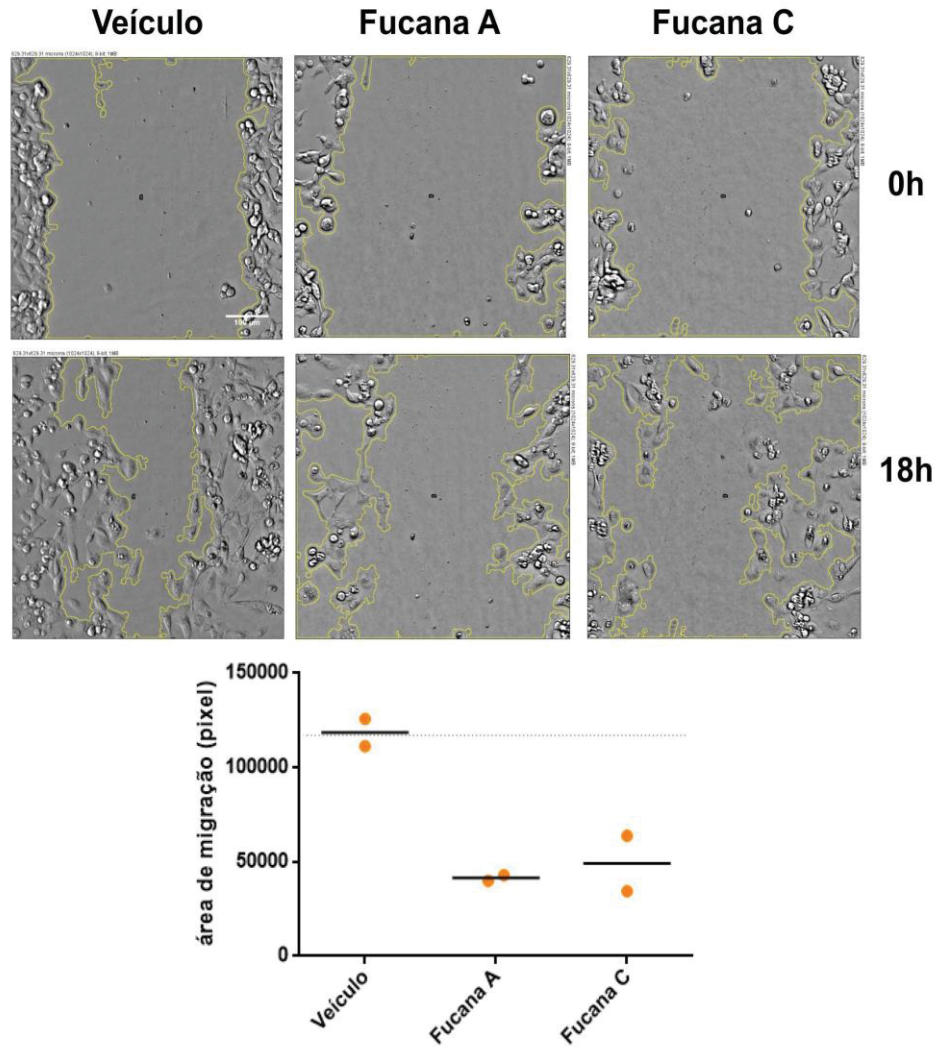
FIGURA 21. EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM A375



Fonte: a autora

Legenda: Imagens representativas do ensaio de migração realizado com células da linhagem A375 pré-tratadas com os polissacarídeos a 100 µg/mL por 72h. Barra de escala = 100 µm

FIGURA 22. EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM SKMEL-147



Fonte: a autora

Legenda: Imagens representativas do ensaio de migração realizado com células da linhagem SKMEL-147 pré-tratadas com os polissacarídeos a 100 µg/mL por 72h. Barra de escala = 100 µm

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo em linhagens de melanoma com diferentes subtipos moleculares permitem sugerir que, tanto Fucana A, quanto Fucana C são moléculas promissoras como agentes antimelanoma, sendo a primeira indicada para o melanoma triplo selvagem. Essa conclusão é fundamentada nos seguintes efeitos:

- Os polissacarídeos Fucana A e C não apresentaram citotoxicidade em concentrações de até 100 µg/mL e tempo de incubação de até 72h;
- A Fucana A promoveu efeitos mais expressivos na linhagem de melanoma humano triplo-selvagem (CHL-1), incluindo: inibição da proliferação celular evidenciada pelo aumento do número de células na fase G1 do ciclo celular, sendo esse efeito citostático comparável ao do quimioterápico Cisplatina e ao bloqueio de receptor CD44; inibiu a formação de redes pseudo-vasculares (mimetismo vasculogênico) em apenas 24h de exposição e modulou a expressão de moléculas envolvidas em vias de sinalização relacionadas à proliferação (β -catenina, CD44, hialuronam sintase e versicam);
- A detecção citoquímica da Fucana A permitiu sugerir que esta molécula é internalizada pela linhagem *BRAF*-mutante e interage com a membrana celular da linhagem triplo-selvagem;
- Resultados preliminares sugerem que ambas as Fucanas podem modular fenótipos tumorais (invasão e migração celular) nas linhagens metastáticas A375 e SKMEL-147.

REFERÊNCIAS

- AHRENS, T., ASSMANN, V., *ET AL.* (2001) 'CD44 IS THE PRINCIPAL MEDIATOR OF HYALURONIC-ACID-INDUCED MELANOMA CELL PROLIFERATION', *THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY*, 116(1), PP. 93–101.
- AHRENS, T., SLEEMAN, J. P., *ET AL.* (2001) 'SOLUBLE CD44 INHIBITS MELANOMA TUMOR GROWTH BY BLOCKING CELL SURFACE CD44 BINDING TO HYALURONIC ACID', *ONCOGENE*, 20(26), PP. 3399–3408.
- AISA, Y. *ET AL.* (2005) 'FUCOIDAN INDUCES APOPTOSIS OF HUMAN HS-SULTAN CELLS ACCOMPANIED BY ACTIVATION OF CASPASE-3 AND DOWN-REGULATION OF ERK PATHWAYS', *AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY*, 78(1), PP. 7–14.
- ALEKSEYENKO, T. V. *ET AL.* (2007) 'ANTITUMOR AND ANTIMETASTATIC ACTIVITY OF FUCOIDAN, A SULFATED POLYSACCHARIDE ISOLATED FROM THE OKHOTSK SEA FUCUS EVANESCENS BROWN ALGA', *BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 143(6), PP. 730–732.
- ALE, M. T. *ET AL.* (2011) 'FUCOIDAN FROM SARGASSUM SP. AND FUCUS VESICULOSUS REDUCES CELL VIABILITY OF LUNG CARCINOMA AND MELANOMA CELLS IN VITRO AND ACTIVATES NATURAL KILLER CELLS IN MICE IN VIVO', *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 49(3), PP. 331–336.
- ALE, M. T., MIKKELSEN, J. D. AND MEYER, A. S. (2011) 'IMPORTANT DETERMINANTS FOR FUCOIDAN BIOACTIVITY: A CRITICAL REVIEW OF STRUCTURE-FUNCTION RELATIONS AND EXTRACTION METHODS FOR FUCOSE-CONTAINING SULFATED POLYSACCHARIDES FROM BROWN SEAWEEDES', *MARINE DRUGS*, 9(10), PP. 2106–2130.
- ALEXANDROV, L. B. *ET AL.* (2013) 'DECIPHERING SIGNATURES OF MUTATIONAL PROCESSES OPERATIVE IN HUMAN CANCER', *CELL REPORTS*, PP. 246–259. DOI: 10.1016/J.CELREP.2012.12.008.
- ALLA, V. *ET AL.* (2010) 'E2F1 IN MELANOMA PROGRESSION AND METASTASIS', *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 102(2), PP. 127–133.
- ALMEIDA-LIMA, J. *ET AL.* (2010) 'EVALUATING THE POSSIBLE GENOTOXIC, MUTAGENIC AND TUMOR CELL PROLIFERATION-INHIBITION EFFECTS OF A NON-ANTICOAGULANT, BUT ANTITHROMBOTIC ALGAL HETEROFUCAN', *JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY: JAT*, 30(7), PP. 708–715.
- ALMEIDA-LIMA, J. *ET AL.* (2011) 'EVALUATION OF ACUTE AND SUBCHRONIC TOXICITY OF A NON-ANTICOAGULANT, BUT ANTITHROMBOTIC ALGAL HETEROFUCAN FROM THE SPATOGLOSSUM SCHRÖEDERI IN WISTAR RATS', *REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA*, PP. 674–679. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000098.
- ALWARSAMY, M., GOONERATNE, R. AND RAVICHANDRAN, R. (2016) 'EFFECT OF FUCOIDAN FROM TURBINARIA CONOIDES ON HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA EPITHELIAL (A549) CELLS', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, PP. 207–213. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2016.06.112.
- AMIRI, K. I. AND RICHMOND, A. (2005) 'ROLE OF NUCLEAR FACTOR-KAPPA B IN MELANOMA', *CANCER METASTASIS REVIEWS*, 24(2), PP. 301–313.
- AMSCHLER, K. *ET AL.* (2010) 'NF-KAPPAB INHIBITION THROUGH PROTEASOME INHIBITION OR IKKBETA BLOCKADE INCREASES THE SUSCEPTIBILITY OF MELANOMA CELLS TO CYTOSTATIC TREATMENT THROUGH DISTINCT PATHWAYS', *THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY*, 130(4), PP. 1073–1086.
- ASCIERTO, P. A. *ET AL.* (2016) 'COMPLETE RESPONSE TO NIVOLUMAB MONOTHERAPY IN A TREATMENT-NAIVE, BRAF WILD-TYPE PATIENT WITH ADVANCED MUCOSAL MELANOMA AND ELEVATED LACTATE DEHYDROGENASE: A CASE REPORT FROM A PHASE III TRIAL', *CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY: CII*, 65(11), PP. 1395–1400.
- ASCIERTO, P. A. *ET AL.* (2019) 'DABRAFENIB, TRAMETINIB AND PEMBROLIZUMAB OR PLACEBO IN BRAF-MUTANT MELANOMA', *NATURE MEDICINE*, 25(6), PP. 941–946.
- ATASHRAZM, F., LOWENTHAL, R., *ET AL.* (2015) 'FUCOIDAN AND CANCER: A MULTIFUNCTIONAL MOLECULE WITH ANTI-TUMOR POTENTIAL', *MARINE DRUGS*, PP. 2327–2346. DOI: 10.3390/MD13042327.
- ATASHRAZM, F. *ET AL.* (2016) 'FUCOIDAN SUPPRESSES THE GROWTH OF HUMAN ACUTE PROMYELOCYTIC

LEUKEMIA CELLS IN VITRO AND IN VIVO', *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, 231(3), PP. 688–697.

ATKINS, M. B. *ET AL.* (1999) 'HIGH-DOSE RECOMBINANT INTERLEUKIN 2 THERAPY FOR PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA: ANALYSIS OF 270 PATIENTS TREATED BETWEEN 1985 AND 1993', *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, PP. 2105–2105. DOI: 10.1200/JCO.1999.17.7.2105.

ATKINS, M. B. *ET AL.* (2000) 'HIGH-DOSE RECOMBINANT INTERLEUKIN-2 THERAPY IN PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA: LONG-TERM SURVIVAL UPDATE', *THE CANCER JOURNAL FROM SCIENTIFIC AMERICAN*, 6 SUPPL 1, PP. S11–4.

BALLANTYNE, A. D. AND GARNOCK-JONES, K. P. (2013) 'DABRAFENIB: FIRST GLOBAL APPROVAL', *DRUGS*, PP. 1367–1376. DOI: 10.1007/s40265-013-0095-2.

BANAFI, A. M. *ET AL.* (2013) 'FUCOIDAN INDUCES G1 PHASE ARREST AND APOPTOSIS THROUGH CASPASES-DEPENDENT PATHWAY AND ROS INDUCTION IN HUMAN BREAST CANCER MCF-7 CELLS', *JOURNAL OF HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY. MEDICAL SCIENCES = HUA ZHONG KE JI DA XUE XUE BAO. YI XUE YING DE WEN BAN = HUAZHONG KEJI DAXUE XUEBAO. YIXUE YINGDEWEN BAN*, 33(5), PP. 717–724.

BARROSO, E. M. A. *ET AL.* (2008) 'A NON-ANTICOAGULANT HETEROFUCAN HAS ANTITHROMBOTIC ACTIVITY IN VIVO', *PLANTA MEDICA*, 74(7), PP. 712–718.

BEAVER, J. A. *ET AL.* (2017) 'FDA APPROVAL OF NIVOLUMAB FOR THE FIRST-LINE TREATMENT OF PATIENTS WITH BRAFV600 WILD-TYPE UNRESECTABLE OR METASTATIC MELANOMA', *CLINICAL CANCER RESEARCH*, PP. 3479–3483. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0714.

BECKER, T. M. *ET AL.* (2005) 'IMPAIRED INHIBITION OF NF-KAPPAB ACTIVITY BY MELANOMA-ASSOCIATED P16INK4A MUTATIONS', *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 332(3), PP. 873–879.

BERWICK, M. *ET AL.* (2016) 'MELANOMA EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION', *MELANOMA*, PP. 17–49. DOI: 10.1007/978-3-319-22539-5_2.

BHATIA, S., TYKODI, S. S. AND THOMPSON, J. A. (2009) 'TREATMENT OF METASTATIC MELANOMA: AN OVERVIEW', *ONCOLOGY*, 23(6), PP. 488–496.

BIENZ, M. (2005) 'BETA-CATENIN: A PIVOT BETWEEN CELL ADHESION AND WNT SIGNALLING', *CURRENT BIOLOGY: CB*, 15(2), PP. R64–7.

BINI, I. H. (2018) *AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL IN VIVO DE FUCANA A EM MELANOMA MURINO. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) . UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.*

BOESPFLUG, A. *ET AL.* (2017) 'TREATMENT OF -MUTATED ADVANCED OR METASTATIC MELANOMA: RATIONALE, CURRENT TRIALS AND EVIDENCE TO DATE', *THERAPEUTIC ADVANCES IN MEDICAL ONCOLOGY*, 9(7), PP. 481–492.

BOO, H.-J. *ET AL.* (2013) 'THE ANTICANCER EFFECT OF FUCOIDAN IN PC-3 PROSTATE CANCER CELLS', *MARINE DRUGS*, 11(8), PP. 2982–2999.

BRAY, F. *ET AL.* (2018) 'GLOBAL CANCER STATISTICS 2018: GLOBOCAN ESTIMATES OF INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE FOR 36 CANCERS IN 185 COUNTRIES', *CA: A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS*, 68(6), PP. 394–424.

BRÜCHER, B. L. D. M. *ET AL.* (2019) 'NF-KB SIGNALING AND CROSSTALK DURING CARCINOGENESIS', *4OPEN*, P. 13. DOI: 10.1051/FOPEN/2019010.

CAO, H. T. T. *ET AL.* (2018) 'NOVEL ENZYME ACTIONS FOR SULPHATED GALACTOFUCAN DEPOLYMERISATION AND A NEW ENGINEERING STRATEGY FOR MOLECULAR STABILISATION OF FUCOIDAN DEGRADING ENZYMES', *MARINE DRUGS*, 16(11). DOI: 10.3390/MD16110422.

CARROLL, A. R. *ET AL.* (2019) 'MARINE NATURAL PRODUCTS', *NATURAL PRODUCT REPORTS*, 36(1), PP. 122–173.

CELL LINES BY GENETIC MUTATION (NO DATE). AVAILABLE AT:
[HTTPS://WWW.ATCC.ORG/EN/PRODUCTS/CELLS_AND_MICROORGANISMS/CELL_LINES/CELL_LINES_BY_GENETIC_MUTATION.ASPX](https://www.atcc.org/en/products/cells_and_microorganisms/cell_lines/cell_lines_by_genetic_mutation.aspx) (ACCESSED: 22 JUNE 2020).

- CHAPMAN, P. B. *ET AL.* (2011) 'IMPROVED SURVIVAL WITH VEMURAFENIB IN MELANOMA WITH BRAF V600E MUTATION', *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 364(26), PP. 2507–2516.
- CHE, J.-P. *ET AL.* (2013) 'EXPRESSION AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE NIN ONE BINDING PROTEIN AND P38 MAPK IN PROSTATE CARCINOMA', *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY*, 6(11), PP. 2300–2311.
- CHEN, C. *ET AL.* (2018) 'THE BIOLOGY AND ROLE OF CD44 IN CANCER PROGRESSION: THERAPEUTIC IMPLICATIONS', *JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY*, 11(1), P. 54.
- CHEN, H. *ET AL.* (2016) 'SULFATED FUCOIDAN FP08S2 INHIBITS LUNG CANCER CELL GROWTH IN VIVO BY DISRUPTING ANGIOGENESIS VIA TARGETING VEGFR2/VEGF AND BLOCKING VEGFR2/ERK/VEGF SIGNALING', *CANCER LETTERS*, 382(1), PP. 44–52.
- CHEN, M.-C. *ET AL.* (2015) 'LOW MOLECULAR WEIGHT FUCOIDAN INHIBITS TUMOR ANGIOGENESIS THROUGH DOWNREGULATION OF HIF-1/VEGF SIGNALING UNDER HYPOXIA', *MARINE DRUGS*, 13(7), PP. 4436–4451.
- CHEN, M.-C. *ET AL.* (2016) 'COMBINED ADMINISTRATION OF FUCOIDAN AMELIORATES TUMOR AND CHEMOTHERAPY-INDUCED SKELETAL MUSCLE ATROPHY IN BLADDER CANCER-BEARING MICE', *ONCOTARGET*, 7(32), PP. 51608–51618.
- CHEN, Q., KANG, J. AND FU, C. (2018) 'THE INDEPENDENCE OF AND ASSOCIATIONS AMONG APOPTOSIS, AUTOPHAGY, AND NECROSIS', *SIGNAL TRANSDUCTION AND TARGETED THERAPY*, 3, P. 18.
- CHEN, S. *ET AL.* (2014) 'FUCOIDAN INDUCES CANCER CELL APOPTOSIS BY MODULATING THE ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS CASCADES', *PLOS ONE*, 9(9), P. E108157.
- CHOO, G.-S. *ET AL.* (2016) 'ANTICANCER EFFECT OF FUCOIDAN ON DU-145 PROSTATE CANCER CELLS THROUGH INHIBITION OF PI3K/AKT AND MAPK PATHWAY EXPRESSION', *MARINE DRUGS*, 14(7). DOI: 10.3390/MD14070126.
- CHO, T.-M., KIM, W.-J. AND MOON, S.-K. (2014) 'AKT SIGNALING IS INVOLVED IN FUCOIDAN-INDUCED INHIBITION OF GROWTH AND MIGRATION OF HUMAN BLADDER CANCER CELLS', *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY: AN INTERNATIONAL JOURNAL PUBLISHED FOR THE BRITISH INDUSTRIAL BIOLOGICAL RESEARCH ASSOCIATION*, 64, PP. 344–352.
- COCKERELL, C. J. (2012) 'THE PATHOLOGY OF MELANOMA', *DERMATOLOGIC CLINICS*, 30(3), PP. 445–468.
- CONG, Q. *ET AL.* (2016) 'STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND EFFECT ON ANTI-ANGIOGENIC ACTIVITY OF A FUCOIDAN FROM SARGASSUM FUSIFORME', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, PP. 899–907. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2015.09.087.
- CORRÊA, F. DE M. *ET AL.* (2019) 'TARGET THERAPY VERSUS DACARBAZINE IN FIRST-LINE TREATMENT OF ADVANCED NON-SURGICAL AND METASTATIC MELANOMA: BUDGET IMPACT ANALYSIS FROM THE PERSPECTIVE OF THE BRAZILIAN NATIONAL HEALTH SYSTEM, 2018-2020', *EPIDEMIOLOGIA E SERVICOS DE SAUDE : REVISTA DO SISTEMA UNICO DE SAUDE DO BRASIL*, 28(2), P. E2018325.
- COSTA, L. S. *ET AL.* (2010) 'BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SULFATED POLYSACCHARIDES FROM TROPICAL SEAWEEDS', *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY = BIOMEDECINE & PHARMACOTHERAPIE*, 64(1), PP. 21–28.
- DANTAS-SANTOS, N. *ET AL.* (2012) 'ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF FUCAN NANOGEL', *MARINE DRUGS*, 10(9), PP. 2002–2022.
- DAS, R., PHILIP, S., MAHABELESWAR, G., *ET AL.* (2005) 'OSTEOPONTIN: IT'S ROLE IN REGULATION OF CELL MOTILITY AND NUCLEAR FACTOR KB-MEDIATED UROKINASE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR EXPRESSION', *IUBMB LIFE (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: LIFE)*, PP. 441–447. DOI: 10.1080/15216540500159424.
- DELGADO-BELLIDO, D., SERRANO-SAENZ, S., FERNÁNDEZ-CORTÉS, M. AND OLIVER, F. J. (2017) 'VASCULOGENIC MIMICRY SIGNALING REVISITED: FOCUS ON NON-VASCULAR VE-CADHERIN', *MOLECULAR CANCER*, 16(1), P. 65.
- DENIAUD-BOUËT, E. *ET AL.* (2017) 'A REVIEW ABOUT BROWN ALGAL CELL WALLS AND FUCOSE-CONTAINING

SULFATED POLYSACCHARIDES: CELL WALL CONTEXT, BIOMEDICAL PROPERTIES AND KEY RESEARCH CHALLENGES', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, PP. 395–408. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2017.07.082.

DEUX, J.-F. ET AL. (2002) 'LOW MOLECULAR WEIGHT FUCOIDAN PREVENTS NEOINTIMAL HYPERPLASIA IN RABBIT ILIAC ARTERY IN-STENT RESTENOSIS MODEL', *ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY*, 22(10), PP. 1604–1609.

DE VELASCO, G. ET AL. (2017) 'COMPREHENSIVE META-ANALYSIS OF KEY IMMUNE-RELATED ADVERSE EVENTS FROM CTLA-4 AND PD-1/PD-L1 INHIBITORS IN CANCER PATIENTS', *CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH*, 5(4), PP. 312–318.

DOMINGUES, B. ET AL. (2018) 'MELANOMA TREATMENT IN REVIEW', *IMMUNOTARGETS AND THERAPY*, 7, PP. 35–49.

D'ORAZIO, J. ET AL. (2013) 'UV RADIATION AND THE SKIN', *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 14(6), PP. 12222–12248.

DOUBLING TIME - ONLINE COMPUTING WITH 2 POINTS (NO DATE). AVAILABLE AT: [HTTPS://DOUBLING-TIME.COM/COMPUTE.PHP](https://doubling-time.com/compute.php) (ACCESSED: 22 MAY 2020).

DYSHLOVOY, S. A. AND HONECKER, F. (2019) 'MARINE COMPOUNDS AND CANCER: THE FIRST TWO DECADES OF XXI CENTURY', *MARINE DRUGS*, 18(1). DOI: 10.3390/MD18010020.

EDGE, S. B. AND COMPTON, C. C. (2010) 'THE AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER: THE 7TH EDITION OF THE AJCC CANCER STAGING MANUAL AND THE FUTURE OF TNM', *ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY*, PP. 1471–1474. DOI: 10.1245/S10434-010-0985-4.

ELDER, D. E. ET AL. (2020) 'THE 2018 WORLD HEALTH ORGANIZATION CLASSIFICATION OF CUTANEOUS, MUCOSAL, AND UVEAL MELANOMA: DETAILED ANALYSIS OF 9 DISTINCT SUBTYPES DEFINED BY THEIR EVOLUTIONARY PATHWAY', *ARCHIVES OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE*, 144(4), PP. 500–522.

ESTUDOS CLÍNICOS COM INSCRIÇÕES ABERTAS NO INCA (2018) *INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER*. AVAILABLE AT: [HTTPS://WWW.INCA.GOV.BR/PESQUISA/ENSAIOS-CLINICOS/ESTUDOS-CLINICOS-COM-INSCRICOES-ABERTAS-NO-INCA](https://www.inca.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos/estudos-clinicos-com-inscricoes-abertas-no-inca) (ACCESSED: 14 MAY 2020).

ETMAN, S. M., ELNAGGAR, Y. S. R. AND ABDALLAH, O. Y. (2020) "FUCOIDAN, A NATURAL BIOPOLYMER IN CANCER COMBATING: FROM EDIBLE ALGAE TO NANOCARRIER TAILORING", *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 147, PP. 799–808.

EYERICH, S. ET AL. (2018) 'CUTANEOUS BARRIERS AND SKIN IMMUNITY: DIFFERENTIATING A CONNECTED NETWORK', *TRENDS IN IMMUNOLOGY*, 39(4), PP. 315–327.

FARIES, M. B. AND ARIYAN, S. (2011) 'CURRENT SURGICAL TREATMENT IN MELANOMA', *CURRENT PROBLEMS IN CANCER*, PP. 173–184. DOI: 10.1016/J.CURRPROBLCANCER.2011.07.002.

FERNÁNDEZ-CORTÉS, M., DELGADO-BELLIDO, D. AND JAVIER OLIVER, F. (2019) 'VASCULOGENIC MIMICRY: BECOME AN ENDOTHELIAL CELL "BUT NOT SO MUCH"', *FRONTIERS IN ONCOLOGY*. DOI: 10.3389/FONC.2019.00803.

FERREIRA, V. H. (2012) *AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS SOBRE MODELO DE MELANOMA MURINO*. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR). UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

FIORANELLI, M. ET AL. (2017) 'COMPLETION DISSECTION OR OBSERVATION FOR SENTINEL-NODE METASTASIS IN MELANOMA', *DERMATOLOGIC THERAPY*, P. E12544. DOI: 10.1111/DTH.12544.

FUCUS IMMUNE 30 VEGETARIAN CAPSULES (NO DATE) *NUTRICOLOGY.COM*. AVAILABLE AT: [HTTPS://WWW.NUTRICOLOGY.COM/FUCUS-IMMUNE-60-VEGETARIAN-CAPSULES](https://www.nutricology.com/fucus-immune-60-vegetarian-capsules).

FUKAHORI, S. ET AL. (2008) 'FUCOIDAN, A MAJOR COMPONENT OF BROWN SEAWEED, PROHIBITS THE GROWTH OF HUMAN CANCER CELL LINES IN VITRO', *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*. DOI: 10.3892/MMR.1.4.537.

GALLUZZI, L. ET AL. (2019) 'WNT SIGNALING IN CANCER IMMUNOSURVEILLANCE', *TRENDS IN CELL BIOLOGY*,

29(1), pp. 44–65.

GARMAN, B. *ET AL.* (2017) 'GENETIC AND GENOMIC CHARACTERIZATION OF 462 MELANOMA PATIENT-DERIVED XENOGRAPHS, TUMOR BIOPSIES, AND CELL LINES', *CELL REPORTS*, 21(7), pp. 1936–1952.

GARNOCK-JONES, K. P. (2015) 'COBIMETINIB: FIRST GLOBAL APPROVAL', *DRUGS*, 75(15), pp. 1823–1830.

GERSHENWALD, J. E. *ET AL.* (2017) 'MELANOMA STAGING: EVIDENCE-BASED CHANGES IN THE AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER EIGHTH EDITION CANCER STAGING MANUAL', *CA: A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS*, 67(6), pp. 472–492.

GERSHENWALD, J. E. AND SCOLYER, R. A. (2018) 'MELANOMA STAGING: AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC) 8TH EDITION AND BEYOND', *ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY*, 25(8), pp. 2105–2110.

GIDE, T. N. *ET AL.* (2018) 'PRIMARY AND ACQUIRED RESISTANCE TO IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS IN METASTATIC MELANOMA', *CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH*, 24(6), pp. 1260–1270.

GILLIES, R. J., DIDIER, N. AND DENTON, M. (1986) 'DETERMINATION OF CELL NUMBER IN MONOLAYER CULTURES', *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 159(1), pp. 109–113.

GURZU, S., BELEAUA, M. A. AND JUNG, I. (2018) 'THE ROLE OF TUMOR MICROENVIRONMENT IN DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF MALIGNANT MELANOMAS - A SYSTEMATIC REVIEW', *ROMANIAN JOURNAL OF MORPHOLOGY AND EMBRYOLOGY = REVUE ROUMAINE DE MORPHOLOGIE ET EMBRYOLOGIE*, 59(1), pp. 23–28.

GUTERRES, A. N. AND MEENHARD HERLYN AND (2018) 'MELANOMA', IN: ELS. JOHN WILEY & SONS, LTD:CHICHESTER.

HANAHAN, D. AND WEINBERG, R. A. (2011) 'HALLMARKS OF CANCER: THE NEXT GENERATION', *CELL*, pp. 646–674. DOI: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.

HANEJI, K. *ET AL.* (2005) 'FUCOIDAN EXTRACTED FROM CLADOSIPHON OKAMURANUS TOKIDA INDUCES APOPTOSIS OF HUMAN T-CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE 1-INFECTED T-CELL LINES AND PRIMARY ADULT T-CELL LEUKEMIA CELLS', *NUTRITION AND CANCER*, 52(2), pp. 189–201.

HAN, M. H. *ET AL.* (2017) 'FUCOIDAN INDUCES ROS-DEPENDENT APOPTOSIS IN 5637 HUMAN BLADDER CANCER CELLS BY DOWNREGULATING TELOMERASE ACTIVITY VIA INACTIVATION OF THE PI3K/AKT SIGNALING PATHWAY', *DRUG DEVELOPMENT RESEARCH*, 78(1), pp. 37–48.

HAN, Y.-S., LEE, J. H. AND LEE, S. H. (2015) 'ANTITUMOR EFFECTS OF FUCOIDAN ON HUMAN COLON CANCER CELLS VIA ACTIVATION OF AKT SIGNALING', *BIOMOLECULES & THERAPEUTICS*, 23(3), pp. 225–232.

HAUSCHILD, A. *ET AL.* (2012) 'DABRAFENIB IN BRAF-MUTATED METASTATIC MELANOMA: A MULTICENTRE, OPEN-LABEL, PHASE 3 RANDOMISED CONTROLLED TRIAL', *THE LANCET*, 380(9839), pp. 358–365.

HAYAKAWA, Y. *ET AL.* (2011) 'APOPTOSIS SIGNAL-REGULATING KINASE 1 AND CYCLIN D1 COMPOSE A POSITIVE FEEDBACK LOOP CONTRIBUTING TO TUMOR GROWTH IN GASTRIC CANCER', *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES*, pp. 780–785. DOI: 10.1073/PNAS.10114181108.

HAYWARD, N. K. *ET AL.* (2017) 'WHOLE-GENOME LANDSCAPES OF MAJOR MELANOMA SUBTYPES', *NATURE*, 545(7653), pp. 175–180.

HENDRIX, M. J. *ET AL.* (2001) 'EXPRESSION AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF VE-CADHERIN IN AGGRESSIVE HUMAN MELANOMA CELLS: ROLE IN VASCULOGENIC MIMICRY', *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 98(14), pp. 8018–8023.

HENDRIX, M. J. C. *ET AL.* (2016) 'TUMOR CELL VASCULAR MIMICRY: NOVEL TARGETING OPPORTUNITY IN MELANOMA', *PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*, 159, pp. 83–92.

HERNÁNDEZ, D. *ET AL.* (2011) 'ROLE OF VERSICAM V0/V1 AND CD44 IN THE REGULATION OF HUMAN MELANOMA CELL BEHAVIOR', *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, 27(2), pp. 269–275.

HESS, A. R. *ET AL.* (2006) 'VE-CADHERIN REGULATES EPHA2 IN AGGRESSIVE MELANOMA CELLS THROUGH A

NOVEL SIGNALING PATHWAY: IMPLICATIONS FOR VASCULOGENIC MIMICRY', *CANCER BIOLOGY & THERAPY*, 5(2), PP. 228–233.

HEUBERGER, J. AND BIRCHMEIER, W. (2010) 'INTERPLAY OF CADHERIN-MEDIATED CELL ADHESION AND CANONICAL WNT SIGNALING', *COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY*, 2(2), P. A002915.

HODI, F. S. ET AL. (2010) 'IMPROVED SURVIVAL WITH IPILIMUMAB IN PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA', *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, PP. 711–723. DOI: 10.1056/NEJMOA1003466.

HOME - *CLINICALTRIALS.GOV* (NO DATE B). AVAILABLE AT: [HTTPS://CLINICALTRIALS.GOV/CT2/HOME](https://clinicaltrials.gov/ct2/home) (ACCESSED: 14 MAY 2020).

HOMSI, J. ET AL. (2005) 'CUTANEOUS MELANOMA: PROGNOSTIC FACTORS', *CANCER CONTROL: JOURNAL OF THE MOFFITT CANCER CENTER*, 12(4), PP. 223–229.

HSU, H.-Y. ET AL. (2014) 'FUCOIDAN INHIBITION OF LUNG CANCER IN VIVO AND IN VITRO : ROLE OF THE SMURF2-DEPENDENT UBIQUITIN PROTEASOME PATHWAY IN TGF β RECEPTOR DEGRADATION', *ONCOTARGET*, 5(17), PP. 7870–7885.

HSU, H.-Y. ET AL. (2017) 'FUCOIDAN INDUCES TOLL-LIKE RECEPTOR 4-REGULATED REACTIVE OXYGEN SPECIES AND PROMOTES ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS-MEDIATED APOPTOSIS IN LUNG CANCER', *SCIENTIFIC REPORTS*, 7, P. 44990.

HSU, H.-Y. AND HWANG, P.-A. (2019) 'CLINICAL APPLICATIONS OF FUCOIDAN IN TRANSLATIONAL MEDICINE FOR ADJUVANT CANCER THERAPY', *CLINICAL AND TRANSLATIONAL MEDICINE*, 8(1), P. 15.

HUANG, T.-H. ET AL. (2015) 'PROPHYLACTIC ADMINISTRATION OF FUCOIDAN REPRESSES CANCER METASTASIS BY INHIBITING VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AND MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPs) IN LEWIS TUMOR-BEARING MICE', *MARINE DRUGS*, 13(4), PP. 1882–1900.

HWANG, T.-L., SUNG, P.-J. AND LIAW, C.-C. (2019) *DEVELOPMENT AND APPLICATION OF HERBAL MEDICINE FROM MARINE ORIGIN*. MDPI.

HYUN, J.-H. ET AL. (2009) 'APOPTOSIS INDUCING ACTIVITY OF FUCOIDAN IN HCT-15 COLON CARCINOMA CELLS', *BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 32(10), PP. 1760–1764.

ICCVAM. ICCVAM-RECOMMENDED TEST METHOD PROTOCOL BALB/c 3T3 NRU CYTOTOXICITY TEST METHOD. IN: ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT: IN VITRO CYTOTOXICITY TEST METHODS FOR ESTIMATING STARTING DOSES FOR ACUTE ORAL SYSTEMIC TOXICITY TESTS. [S.L: S.N.].

IKEGUCHI, M. ET AL. (2011) 'FUCOIDAN REDUCES THE TOXICITIES OF CHEMOTHERAPY FOR PATIENTS WITH UNRESECTABLE ADVANCED OR RECURRENT COLORECTAL CANCER', *ONCOLOGY LETTERS*, 2(2), PP. 319–322.

ISHII, T. ET AL. (2010) 'NMR CHARACTERIZATION OF ACIDIC XYLO-OLIGOSACCHARIDES CONTAINING TWO METHYLGLUCURONIC ACID RESIDUES FROM JAPANESE CEDAR AND HINOKI CYPRESS', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 81(4), PP. 964–968.

ISHIKAWA, C. AND MORI, N. (2017) 'IN VITRO AND IN VIVO ANTI-PRIMARY EFFUSION LYMPHOMA ACTIVITIES OF FUCOIDAN EXTRACTED FROM CLADOSIPHON OKAMURANUS TOKIDA', *ONCOLOGY REPORTS*, 38(5), PP. 3197–3204.

ISNANSETYO, A. ET AL. (2016) 'CYTOTOXICITY OF FUCOIDAN FROM THREE TROPICAL BROWN ALGAE AGAINST BREAST AND COLON CANCER CELL LINES', *PHARMACOGNOSY JOURNAL*, 9(1), PP. 14–20.

JANJETOVIC, Z. ET AL. (2011) 'HIGH BASAL NF- κ B ACTIVITY IN NONPIGMENTED MELANOMA CELLS IS ASSOCIATED WITH AN ENHANCED SENSITIVITY TO VITAMIN D3 DERIVATIVES', *BRITISH JOURNAL OF CANCER*, 105(12), PP. 1874–1884.

JANUARY, G. G. ET AL. (2019) 'ASSESSING METHODOLOGIES FOR FUCOIDAN EXTRACTION FROM SOUTH AFRICAN BROWN ALGAE', *ALGAL RESEARCH*, 40, P. 101517.

JENKINS, R. W. AND FISHER, D. E. (2020) 'TREATMENT OF ADVANCED MELANOMA IN 2020 AND BEYOND', *THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY*. DOI: 10.1016/J.JID.2020.03.943.

- JIN, J.-O. *ET AL.* (2010) 'THE MECHANISM OF FUCOIDAN-INDUCED APOPTOSIS IN LEUKEMIC CELLS: INVOLVEMENT OF ERK1/2, JNK, GLUTATHIONE, AND NITRIC OXIDE', *MOLECULAR CARCINOGENESIS*, 49(8), PP. 771–782.
- KAGESHITA, T. *ET AL.* (2001) 'LOSS OF BETA-CATENIN EXPRESSION ASSOCIATED WITH DISEASE PROGRESSION IN MALIGNANT MELANOMA', *THE BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY*, 145(2), PP. 210–216.
- KARLEN, Y. *ET AL.* (2007) 'STATISTICAL SIGNIFICANCE OF QUANTITATIVE PCR', *BMC BIOINFORMATICS*, 8, P. 131.
- KASAI, A. *ET AL.* (2015) 'SYSTEMATIC SYNTHESIS OF LOW-MOLECULAR WEIGHT FUCOIDAN DERIVATIVES AND THEIR EFFECT ON CANCER CELLS', *ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY*, 13(42), PP. 10556–10568.
- KAWAHARA, R., NIWA, Y. AND SIMIZU, S. (2018) 'INTEGRIN B1 IS AN ESSENTIAL FACTOR IN VASCULOGENIC MIMICRY OF HUMAN CANCER CELLS', *CANCER SCIENCE*, 109(8), PP. 2490–2496.
- KIM, E. J. *ET AL.* (2010) 'FUCOIDAN PRESENT IN BROWN ALGAE INDUCES APOPTOSIS OF HUMAN COLON CANCER CELLS', *BMC GASTROENTEROLOGY*, 10, P. 96.
- KIM, I.-H. AND NAM, T.-J. (2018) 'FUCOIDAN DOWNREGULATES INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I RECEPTOR LEVELS IN HT-29 HUMAN COLON CANCER CELLS', *ONCOLOGY REPORTS*, 39(3), PP. 1516–1522.
- KIM, S. Y. AND YUN, S. J. (2016) 'CUTANEOUS MELANOMA IN ASIANS', *CHONNAM MEDICAL JOURNAL*, 52(3), PP. 185–193.
- KIRKWOOD, J. M. *ET AL.* (2004) 'A POOLED ANALYSIS OF EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP AND INTERGROUP TRIALS OF ADJUVANT HIGH-DOSE INTERFERON FOR MELANOMA', *CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH*, 10(5), PP. 1670–1677.
- KIRSCHMANN, D. A. *ET AL.* (2012) 'MOLECULAR PATHWAYS: VASCULOGENIC MIMICRY IN TUMOR CELLS: DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS', *CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH*, 18(10), PP. 2726–2732.
- KOVACS, D. *ET AL.* (2016) 'THE ROLE OF WNT/B-CATENIN SIGNALING PATHWAY IN MELANOMA EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL-LIKE SWITCHING: EVIDENCES FROM PATIENTS-DERIVED CELL LINES', *ONCOTARGET*, PP. 43295–43314. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.9232.
- KOZAR, K. *ET AL.* (2004) 'CERIVASTATIN DEMONSTRATES ENHANCED ANTITUMOR ACTIVITY AGAINST HUMAN BREAST CANCER CELL LINES WHEN USED IN COMBINATION WITH DOXORUBICIN OR CISPLATIN', *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. DOI: 10.3892/IJO.24.5.1149.
- KUPHAL, S. *ET AL.* (2004) 'LOSS OF E-CADHERIN LEADS TO UPREGULATION OF NFKAPPAB ACTIVITY IN MALIGNANT MELANOMA', *ONCOGENE*, 23(52), PP. 8509–8519.
- LEBARON, R. G., ZIMMERMANN, D. R. AND RUOSLAHTI, E. (1992) 'HYALURONATE BINDING PROPERTIES OF VERSICAM', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 267(14), PP. 10003–10010.
- LEE, H., KIM, J.-S. AND KIM, E. (2012) 'FUCOIDAN FROM SEAWEED FUCUS VESICULOSUS INHIBITS MIGRATION AND INVASION OF HUMAN LUNG CANCER CELL VIA PI3K-AKT-MTOR PATHWAYS', *PLoS ONE*, P. E50624. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0050624.
- LEE, J. *ET AL.* (2017) 'ABSTRACT 5563: 3D BIOLOGY™ VIEW OF CANCER: SIMULTANEOUS DETECTION OF SOMATIC DNA MUTATIONS AND EXPRESSION PROFILING OF GENES AND SIGNALING PROTEINS FROM MELANOMA TUMOR FFPE SAMPLES', *BIOINFORMATICS AND SYSTEMS BIOLOGY*. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2017-5563.
- LEITE, E. L. *ET AL.* (1998) 'STRUCTURE AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF A SULFATED XYLOFUCOGLUCURONAN FROM THE ALGA SPATOGLOSSUM SCHRÖEDERI', *PLANT SCIENCE*, PP. 215–228. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00012-0.
- LEITER, U. *ET AL.* (2016) 'COMPLETE LYMPH NODE DISSECTION VERSUS NO DISSECTION IN PATIENTS WITH SENTINEL LYMPH NODE BIOPSY POSITIVE MELANOMA (DECOG-SLT): A MULTICENTRE, RANDOMISED, PHASE 3 TRIAL', *THE LANCET ONCOLOGY*, 17(6), PP. 757–767.
- LIN, J. Y. AND FISHER, D. E. (2007) 'MELANOCYTE BIOLOGY AND SKIN PIGMENTATION', *NATURE*, PP. 843–850. DOI: 10.1038/NATURE05660.

- LIU, F. *ET AL.* (2016) 'FUCOIDAN INHIBITS ANGIOGENESIS INDUCED BY MULTIPLE MYELOMA CELLS', *ONCOLOGY REPORTS*, 36(4), PP. 1963–1972.
- LIU, J. *ET AL.* (2007) 'ONCOGENIC BRAF REGULATES BETA-TRCP EXPRESSION AND NF-KAPPA B ACTIVITY IN HUMAN MELANOMA CELLS', *ONCOGENE*, 26(13), PP. 1954–1958.
- LIU, J. M. *ET AL.* (2005) 'INHIBITORY EFFECT OF FUCOIDAN ON THE ADHESION OF ADENOCARCINOMA CELLS TO FIBRONECTIN', *ANTICANCER RESEARCH*, 25(3B), PP. 2129–2133.
- LIU, X. *ET AL.* (2014) 'SUPPRESSOR OF FUSED (SUFU) REPRESSES GLI1 TRANSCRIPTION AND NUCLEAR ACCUMULATION, INHIBITS GLIOMA CELL PROLIFERATION, INVASION AND VASCULOGENIC MIMICRY, IMPROVING GLIOMA CHEMO-SENSITIVITY AND PROGNOSIS', *ONCOTARGET*, 5(22), PP. 11681–11694.
- LIVAK, K. J. AND SCHMITTGEN, T. D. (2001) 'ANALYSIS OF RELATIVE GENE EXPRESSION DATA USING REAL-TIME QUANTITATIVE PCR AND THE 2⁻(-DELTA DELTA C(T)) METHOD', *METHODS*, 25(4), PP. 402–408.
- LI, X. *ET AL.* (2017) 'LOW MOLECULAR WEIGHT FUCOIDAN AND ITS FRACTIONS INHIBIT RENAL EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION INDUCED BY TGF-B1 OR FGF-2', *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 105(Pt 2), PP. 1482–1490.
- LONG, G. V. *ET AL.* (2015) 'DABRAFENIB AND TRAMETINIB VERSUS DABRAFENIB AND PLACEBO FOR VAL600 BRAF-MUTANT MELANOMA: A MULTICENTRE, DOUBLE-BLIND, PHASE 3 RANDOMISED CONTROLLED TRIAL', *THE LANCET*, 386(9992), PP. 444–451.
- LU, P. *ET AL.* (2011) 'EXTRACELLULAR MATRIX DEGRADATION AND REMODELING IN DEVELOPMENT AND DISEASE', *COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY*, 3(12). DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A005058.
- LV, L. *ET AL.* (2016) 'UPREGULATION OF CD44V6 CONTRIBUTES TO ACQUIRED CHEMORESISTANCE VIA THE MODULATION OF AUTOPHAGY IN COLON CANCER SW480 CELLS', *TUMOUR BIOLOGY: THE JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ONCODEVELOPMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 37(7), PP. 8811–8824.
- MADONNA, G. *ET AL.* (2012) 'NF-KB AS POTENTIAL TARGET IN THE TREATMENT OF MELANOMA', *JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE*, 10, P. 53.
- MANIOTIS, A. J. *ET AL.* (1999) 'VASCULAR CHANNEL FORMATION BY HUMAN MELANOMA CELLS IN VIVO AND IN VITRO: VASCULOGENIC MIMICRY', *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 155(3), PP. 739–752.
- MANSOUR, M. B. *ET AL.* (2019) 'PRIMARY STRUCTURE AND ANTICOAGULANT ACTIVITY OF FUCOIDAN FROM THE SEA CUCUMBER HOLOTHURIA POLII', *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 121, PP. 1145–1153.
- MASON, R. *ET AL.* (2019) 'CURRENT AND EMERGING SYSTEMIC THERAPIES FOR CUTANEOUS METASTATIC MELANOMA', *EXPERT OPINION ON PHARMACOTHERAPY*, 20(9), PP. 1135–1152.
- MASSARO, R. R. *ET AL.* (2017) 'INHIBITION OF PROLIFERATION AND INVASION IN 2D AND 3D MODELS BY 2-METHOXYESTRADIOL IN HUMAN MELANOMA CELLS', *PHARMACOLOGICAL RESEARCH: THE OFFICIAL JOURNAL OF THE ITALIAN PHARMACOLOGICAL SOCIETY*, 119, PP. 242–250.
- MATSUBARA, K. *ET AL.* (2005) 'EFFECTS OF MIDDLE MOLECULAR WEIGHT FUCOIDANS ON IN VITRO AND EX VIVO ANGIOGENESIS OF ENDOTHELIAL CELLS', *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, 15(4), PP. 695–699.
- MAXIMO, A. I. (2019) *AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UM POLISSACARÍDEO SULFATADO RICO EM FUCOSE EM MODELO DE MELANOMA MURINO IN VITRO*. TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - FARMÁCIA. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.
- McNULTY, S. E. *ET AL.* (2004) 'COMPARATIVE EXPRESSION OF NF-KAPPA B PROTEINS IN MELANOCYTES OF NORMAL SKIN VS. BENIGN INTRADERMAL NAEVUS AND HUMAN METASTATIC MELANOMA BIOPSIES', *PIGMENT CELL RESEARCH*, PP. 173–180. DOI: 10.1111/J.1600-0749.2004.00128.X.
- MEDINA-FRANCO, J. L. (2019) 'NEW APPROACHES FOR THE DISCOVERY OF PHARMACOLOGICALLY-ACTIVE NATURAL COMPOUNDS', *BIOMOLECULES*, 9(3). DOI: 10.3390/BIOM9030115.

MELANOMA AWARENESS & SUPPORT (NO DATE) MELANOMAWA. AVAILABLE AT: [HTTP://MELANOMAWA.ORG.AU](http://melanomawa.org.au).

MENEZES, M. M. ET AL. (2018) 'A LOW-MOLECULAR-WEIGHT GALACTOFUCAN FROM THE SEAWEED, SPATOGLOSSUM SCHRÖEDERI, BINDS FIBRONECTIN AND INHIBITS CAPILLARY-LIKE TUBE FORMATION IN VITRO', *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 111, PP. 1067–1075.

MENSHOVA, R. V. ET AL. (2015) 'STRUCTURE AND ANTICANCER ACTIVITY IN VITRO OF SULFATED GALACTOFUCAN FROM BROWN ALGA ALARIA ANGUSTA', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 132, PP. 118–125.

MIDDLETON, M. R. ET AL. (2000) 'RANDOMIZED PHASE III STUDY OF TEMOZOLOMIDE VERSUS DACARBAZINE IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH ADVANCED METASTATIC MALIGNANT MELANOMA', *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY*, 18(1), PP. 158–166.

MIN, E.-Y. ET AL. (2014) 'THE EFFECTS OF FUCODIAN ON SENESCENCE ARE CONTROLLED BY THE P16INK4A-PRB AND P14ARF-P53 PATHWAYS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND HEPATIC CELL LINES', *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, 45(1), PP. 47–56.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (NO DATE). AVAILABLE AT:

[HTTP://BVMSMS.SAUDE.GOV.BR/BVS/SAUDELEGIS/SAS/2013/PRT0357_08_04_2013.HTML](http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html) (ACCESSED: 14 MAY 2020).

MONTOPOLI, M. ET AL. (2009) 'CELL-CYCLE INHIBITION AND APOPTOSIS INDUCED BY CURCUMIN AND CISPLATIN OR OXALIPLATIN IN HUMAN OVARIAN CARCINOMA CELLS', *CELL PROLIFERATION*, 42(2), PP. 195–206.

NAM, K. ET AL. (2015) 'CD44 REGULATES CELL PROLIFERATION, MIGRATION, AND INVASION VIA MODULATION OF C-SRC TRANSCRIPTION IN HUMAN BREAST CANCER CELLS', *CELLULAR SIGNALLING*, 27(9), PP. 1882–1894.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK® (NCCN®) (2018) *NCCN GUIDELINES FOR PATIENTS®: MELANOMA 2018*.

NEWMAN, D. J. AND CRAGG, G. M. (2016) 'NATURAL PRODUCTS AS SOURCES OF NEW DRUGS FROM 1981 TO 2014', *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 79(3), PP. 629–661.

NEWMAN, D. J. AND CRAGG, G. M. (2020) 'NATURAL PRODUCTS AS SOURCES OF NEW DRUGS OVER THE NEARLY FOUR DECADES FROM 01/1981 TO 09/2019', *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 83(3), PP. 770–803.

OKAZAKI, T. AND HONJO, T. (2007) 'PD-1 AND PD-1 LIGANDS: FROM DISCOVERY TO CLINICAL APPLICATION', *INTERNATIONAL IMMUNOLOGY*, 19(7), PP. 813–824.

OLIVEIRA, C. ET AL. (2017) 'THE KEY ROLE OF SULFATION AND BRANCHING ON FUCODIAN ANTITUMOR ACTIVITY', *MACROMOLECULAR BIOSCIENCE*, 17(5). DOI: 10.1002/mabi.201600340.

OTTES VASCONCELOS, R. ET AL. (2019) 'COMBINATION OF Ω -3 FATTY ACIDS AND CISPLATIN AS A POTENTIAL ALTERNATIVE STRATEGY FOR PERSONALIZED THERAPY OF METASTATIC MELANOMA: AN IN-VITRO STUDY', *MELANOMA RESEARCH*, 29(3), PP. 270–280.

PALANISAMY, S. ET AL. (2017) 'ISOLATION OF FUCODIAN FROM SARGASSUM POLYCYSTUM BROWN ALGAE: STRUCTURAL CHARACTERIZATION, IN VITRO ANTIOXIDANT AND ANTICANCER ACTIVITY', *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 102, PP. 405–412.

PALANISAMY, S. ET AL. (2018) 'INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTICANCER POTENTIAL OF FUCODIAN FROM SARGASSUM POLYCYSTUM', *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, PP. 151–161. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2018.04.163.

PALMIERI, G. ET AL. (2009) 'MAIN ROADS TO MELANOMA', *JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE*, 7, P. 86.

PARK, H. ET AL. (2013) 'INDUCTION OF APOPTOSIS BY FUCODIAN IN HUMAN LEUKEMIA U937 CELLS THROUGH ACTIVATION OF P38 MAPK AND MODULATION OF BCL-2 FAMILY', *MARINE DRUGS*, PP. 2347–2364. DOI: 10.3390/MD11072347.

PARK, H. S. ET AL. (2011) 'ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF FUCODIAN WAS ASSOCIATED WITH THE INDUCTION OF APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN AGS HUMAN GASTRIC CANCER CELLS', *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*, PP. T77–T83. DOI: 10.1111/J.1750-3841.2011.02099.X.

- PARK, H. Y. *ET AL.* (2014) 'FUCOIDAN INHIBITS THE PROLIFERATION OF HUMAN URINARY BLADDER CANCER T24 CELLS BY BLOCKING CELL CYCLE PROGRESSION AND INDUCING APOPTOSIS', *MOLECULES*, 19(5), PP. 5981–5998.
- PARK, H. Y. *ET AL.* (2015) 'FUCOIDAN INDUCES G1 ARREST OF THE CELL CYCLE IN EJ HUMAN BLADDER CANCER CELLS THROUGH DOWN-REGULATION OF PRB PHOSPHORYLATION', *REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA*, PP. 246–251. DOI: 10.1016/J.BJP.2015.03.011.
- PARK, H. Y. *ET AL.* (2017) 'INDUCTION OF P53-INDEPENDENT APOPTOSIS AND G1 CELL CYCLE ARREST BY FUCOIDAN IN HCT116 HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELLS', *MARINE DRUGS*, 15(6). DOI: 10.3390/MD15060154.
- PAVLICK, A. C. *ET AL.* (2019) 'FRONTLINE THERAPY FOR -MUTATED METASTATIC MELANOMA: HOW DO YOU CHOOSE, AND IS THERE ONE CORRECT ANSWER?', *AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY EDUCATIONAL BOOK. AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. ANNUAL MEETING*, 39, PP. 564–571.
- PEARCE, A. *ET AL.* (2017) 'INCIDENCE AND SEVERITY OF SELF-REPORTED CHEMOTHERAPY SIDE EFFECTS IN ROUTINE CARE: A PROSPECTIVE COHORT STUDY', *PLOS ONE*, 12(10), P. E0184360.
- POMIN, V. H. AND MOURÃO, P. A. S. (2008) 'STRUCTURE, BIOLOGY, EVOLUTION, AND MEDICAL IMPORTANCE OF SULFATED FUCANS AND GALACTANS', *GLYCOBIOLOGY*, 18(12), PP. 1016–1027.
- POOLE, R. M. (2014) 'PEMBROLIZUMAB: FIRST GLOBAL APPROVAL', *DRUGS*, 74(16), PP. 1973–1981.
- PRADEEP, C. R., SUNILA, E. S. AND KUTTAN, G. (2005) 'EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AND VEGF RECEPTORS IN TUMOR ANGIOGENESIS AND MALIGNANCIES', *INTEGRATIVE CANCER THERAPIES*, 4(4), PP. 315–321.
- PRIGENT-RICHARD, S. *ET AL.* (1998) 'FLUORESCENT AND RADIOLABELING OF POLYSACCHARIDES: BINDING AND INTERNALIZATION EXPERIMENTS ON VASCULAR CELLS', *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH*, 40(2), PP. 275–281.
- RANI, V. (2017) 'INFLUENCE OF SPECIES, GEOGRAPHIC LOCATION, SEASONAL VARIATION AND EXTRACTION METHOD ON THE FUCOIDAN YIELD OF THE BROWN SEAWEEDS OF GULF OF MANNAR, INDIA', *INDIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*. DOI: 10.4172/PHARMACEUTICAL-SCIENCES.1000202.
- RAPISUWON, S. *ET AL.* (2020) 'SYSTEMIC THERAPY FOR MUCOSAL, ACRAL, AND UVEAL MELANOMA', *CUTANEOUS MELANOMA*, PP. 1301–1335. DOI: 10.1007/978-3-030-05070-2_62.
- READ, J., WADT, K. A. W. AND HAYWARD, N. K. (2016) 'MELANOMA GENETICS', *JOURNAL OF MEDICAL GENETICS*, 53(1), PP. 1–14.
- REID, J. M. *ET AL.* (1999) 'METABOLIC ACTIVATION OF DACARBAZINE BY HUMAN CYTOCHROMES P450: THE ROLE OF CYP1A1, CYP1A2, AND CYP2E1', *CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH*, 5(8), PP. 2192–2197.
- REPETTO, G., DEL PESO, A. AND ZURITA, J. L. (2008) 'NEUTRAL RED UPTAKE ASSAY FOR THE ESTIMATION OF CELL VIABILITY/CYTOTOXICITY', *NATURE PROTOCOLS*, PP. 1125–1131. DOI: 10.1038/NPROT.2008.75.
- REUBEN, A. *ET AL.* (2017) 'GENOMIC AND IMMUNE HETEROGENEITY ARE ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL RESPONSES TO THERAPY IN MELANOMA', *NPJ GENOMIC MEDICINE*, 2. DOI: 10.1038/S41525-017-0013-8.
- RIBAS, A. *ET AL.* (2019) 'COMBINED BRAF AND MEK INHIBITION WITH PD-1 BLOCKADE IMMUNOTHERAPY IN BRAF-MUTANT MELANOMA', *NATURE MEDICINE*, 25(6), PP. 936–940.
- ROCHA AMORIM, M. O. *ET AL.* (2016) 'FUCAN-COATED SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED BY A GREEN METHOD INDUCE HUMAN RENAL ADENOCARCINOMA CELL DEATH', *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 93(Pt A), PP. 57–65.
- ROCHA, H. A. *ET AL.* (2005) 'FUCAN INHIBITS CHINESE HAMSTER OVARY CELL (CHO) ADHESION TO FIBRONECTIN BY BINDING TO THE EXTRACELLULAR MATRIX', *PLANTA MEDICA*, PP. 628–633. DOI: 10.1055/S-2005-871268.
- ROCHA, H. A. *ET AL.* (2005) 'A XYLOGALACTOFUCAN FROM THE BROWN SEAWEED SPATOGLOSSUM SCHRÖEDERI

- STIMULATES THE SYNTHESIS OF AN ANTITHROMBOTIC HEPARAN SULFATE FROM ENDOTHELIAL CELLS', *PLANTA MEDICA*, 71(4), PP. 379–381.
- ROGUIN, A. (2006) 'RENE THEOPHILE HYACINTHE LAËNNEC (1781-1826): THE MAN BEHIND THE STETHOSCOPE', *CLINICAL MEDICINE & RESEARCH*, 4(3), PP. 230–235.
- ROMANO, J. D. AND TATONETTI, N. P. (2019) 'INFORMATICS AND COMPUTATIONAL METHODS IN NATURAL PRODUCT DRUG DISCOVERY: A REVIEW AND PERSPECTIVES', *FRONTIERS IN GENETICS*, 10, P. 368.
- ROSSO, J. D. ET AL. (2016) 'UNDERSTANDING THE EPIDERMAL BARRIER IN HEALTHY AND COMPROMISED SKIN: CLINICALLY RELEVANT INFORMATION FOR THE DERMATOLOGY PRACTITIONER: PROCEEDINGS OF AN EXPERT PANEL ROUNDTABLE MEETING', *THE JOURNAL OF CLINICAL AND AESTHETIC DERMATOLOGY*, 9(4 SUPPL 1), PP. S2–S8.
- ROZZO, C. ET AL. (2013) 'MOLECULAR CHANGES INDUCED BY THE CURCUMIN ANALOGUE D6 IN HUMAN MELANOMA CELLS', *MOLECULAR CANCER*, P. 37. DOI: 10.1186/1476-4598-12-37.
- SANJEEWA, K. K. A. ET AL. (2017) 'THE POTENTIAL OF BROWN-ALGAE POLYSACCHARIDES FOR THE DEVELOPMENT OF ANTICANCER AGENTS: AN UPDATE ON ANTICANCER EFFECTS REPORTED FOR FUCOIDAN AND LAMINARAN', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 177, PP. 451–459.
- SANTI, F. C. (2015) *AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES CAUSADAS POR POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM MODELO DE MELANOMA IN VITRO*. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR). UNIVERSIDAD FEDERAL DO PARANÁ.
- SCHADENDORF, D. ET AL. (2015) 'POOLED ANALYSIS OF LONG-TERM SURVIVAL DATA FROM PHASE II AND PHASE III TRIALS OF IPIUMUMAB IN UNRESECTABLE OR METASTATIC MELANOMA', *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY*, 33(17), PP. 1889–1894.
- SEFTOR, R. E. ET AL. (2001) 'COOPERATIVE INTERACTIONS OF LAMININ 5 GAMMA2 CHAIN, MATRIX METALLOPROTEINASE-2, AND MEMBRANE TYPE-1-MATRIX/METALLOPROTEINASE ARE REQUIRED FOR MIMICRY OF EMBRYONIC VASCULOGENESIS BY AGGRESSIVE MELANOMA', *CANCER RESEARCH*, 61(17), PP. 6322–6327.
- SEFTOR, R. E. B. ET AL. (2012) 'TUMOR CELL VASCULOGENIC MIMICRY: FROM CONTROVERSY TO THERAPEUTIC PROMISE', *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 181(4), PP. 1115–1125.
- SERRANO, M., HANNON, G. J. AND BEACH, D. (1993) 'A NEW REGULATORY MOTIF IN CELL-CYCLE CONTROL CAUSING SPECIFIC INHIBITION OF CYCLIN D/CDK4', *NATURE*, 366(6456), PP. 704–707.
- SHAIN, A. H. ET AL. (2018) 'GENOMIC AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS REVEALS INCREMENTAL DISRUPTION OF KEY SIGNALING PATHWAYS DURING MELANOMA EVOLUTION', *CANCER CELL*, 34(1), PP. 45–55.E4.
- SHAIN, A. H., HUNTER SHAIN, A. AND BASTIAN, B. C. (2016) 'FROM MELANOCYTES TO MELANOMAS', *NATURE REVIEWS CANCER*, PP. 345–358. DOI: 10.1038/NRC.2016.37.
- SHARMA, P. ET AL. (2017) 'PRIMARY, ADAPTIVE, AND ACQUIRED RESISTANCE TO CANCER IMMUNOTHERAPY', *CELL*, 168(4), PP. 707–723.
- SHARMA, P. AND ALLISON, J. P. (2015) 'THE FUTURE OF IMMUNE CHECKPOINT THERAPY', *SCIENCE*, PP. 56–61. DOI: 10.1126/SCIENCE.AAA8172.
- SIGMA FUCOIDAN FROM FUCUS VESICULOSUS* (NO DATE) *SIGMA-ALDRICH*. AVAILABLE AT: [HTTPS://WWW.SIGMAALDRICH.COM/CATALOG/PRODUCT/SIGMA/F8190?LANG=PT®ION=BR](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f8190?lang=pt®ion=br).
- SIISKONEN, H. ET AL. (2015) 'HYALURONAN SYNTHASE 1: A MYSTERIOUS ENZYME WITH UNEXPECTED FUNCTIONS', *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 6, P. 43.
- SILCHENKO, A. S. ET AL. (2017) 'STRUCTURE, ENZYMATIC TRANSFORMATION, ANTICANCER ACTIVITY OF FUCOIDAN AND SULPHATED FUCOOLIGOSACCHARIDES FROM SARGASSUM HORNERI', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, PP. 654–660. DOI: 10.1016/J.CARBPOL.2017.08.043.
- SIMAS, F. F. ET AL. (2004) 'STRUCTURE OF A HETEROXYLAN OF GUM EXUDATE OF THE PALM SCHEELEA PHALERATA (URICURI)', *PHYTOCHEMISTRY*, 65(16), PP. 2347–2355.

SINNBERG, T. *ET AL.* (2011) 'B-CATENIN SIGNALING INCREASES DURING MELANOMA PROGRESSION AND PROMOTES TUMOR CELL SURVIVAL AND CHEMORESISTANCE', *PLOS ONE*, 6(8), P. E23429.

SKIN DEWI FUCOIDAN (SKINCARE ORGANIC) (NO DATE) *SKIN DEWI*. AVAILABLE AT: [HTTPS://SKINDEWI.COM/EN/SKIN-DEWI-FUCOIDAN-SKINCARE-ORGANIC-EXPIRED-SEPTEMBER-2020](https://skindewi.com/en/skin-dewi-fucoidan-skincare-organic-expired-september-2020).

SONG, I.-S. *ET AL.* (2004) 'ROLE OF HUMAN COPPER TRANSPORTER CTR1 IN THE TRANSPORT OF PLATINUM-BASED ANTITUMOR AGENTS IN CISPLATIN-SENSITIVE AND CISPLATIN-RESISTANT CELLS', *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS*, 3(12), PP. 1543–1549.

SONG, Y. *ET AL.* (2013) 'MICRORNA-9 INHIBITS VASCULOGENIC MIMICRY OF GLIOMA CELL LINES BY SUPPRESSING STATHMIN EXPRESSION', *JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY*, 115(3), PP. 381–390.

STUDY OF OLIGO-FUCOIDAN IN ADVANCED HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) - FULL TEXT VIEW - CLINICAL TRIALS.GOV (NO DATE). AVAILABLE AT: [HTTPS://CLINICALTRIALS.GOV/CT2/SHOW/NCT04066660](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04066660) (ACCESSED: 18 JUNE 2020).

SULLIVAN, R. J. *ET AL.* (2019) 'ATEZOLIZUMAB PLUS COBIMETINIB AND VEMURAFENIB IN BRAF-MUTATED MELANOMA PATIENTS', *NATURE MEDICINE*, 25(6), PP. 929–935.

SUN, B. *ET AL.* (2004) 'VASCULOGENIC MIMICRY IS ASSOCIATED WITH POOR SURVIVAL IN PATIENTS WITH MESOTHELIAL SARCOMAS AND ALVEOLAR RHABDOMYOSARCOMAS', *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. DOI: 10.3892/IJO.25.6.1609.

SUN, T. *ET AL.* (2010) 'EXPRESSION AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF TWIST1 IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA: ITS ROLE IN VASCULOGENIC MIMICRY', *HEPATOLOGY*, 51(2), PP. 545–556.

TAN, L. Y., MINTOFF, C., ZAHIED JOHAN, M., *ET AL.* (2016) 'DESMOGLEIN 2 PROMOTES VASCULOGENIC MIMICRY IN MELANOMA AND IS ASSOCIATED WITH POOR CLINICAL OUTCOME', *ONCOTARGET*, PP. 46492–46508. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.10216.

TARHINI, A. A., GOGAS, H. AND KIRKWOOD, J. M. (2012) 'IFN-A IN THE TREATMENT OF MELANOMA', *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 189(8), PP. 3789–3793.

TAYLOR, S. C., LAPERRIERE, G. AND GERMAIN, H. (2017) 'DROPLET DIGITAL PCR VERSUS qPCR FOR GENE EXPRESSION ANALYSIS WITH LOW ABUNDANT TARGETS: FROM VARIABLE NONSENSE TO PUBLICATION QUALITY DATA', *SCIENTIFIC REPORTS*, 7(1), P. 2409.

TCGA (2015) 'GENOMIC CLASSIFICATION OF CUTANEOUS MELANOMA', *CELL*, 161(7), PP. 1681–1696.

TENG, H. *ET AL.* (2015) 'FUCOIDAN SUPPRESSES HYPOXIA-INDUCED LYMPHANGIOGENESIS AND LYMPHATIC METASTASIS IN MOUSE HEPATOCARCINOMA', *MARINE DRUGS*, 13(6), PP. 3514–3530.

THE AUXILIARY EFFECTS OF FUCOIDAN FOR LOCALLY ADVANCED RECTAL CANCER PATIENTS - FULL TEXT VIEW - CLINICAL TRIALS.GOV (NO DATE). AVAILABLE AT: [HTTPS://CLINICALTRIALS.GOV/CT2/SHOW/NCT04342949](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04342949) (ACCESSED: 18 JUNE 2020).

THOMFORD, N. E. *ET AL.* (2018) 'NATURAL PRODUCTS FOR DRUG DISCOVERY IN THE 21ST CENTURY: INNOVATIONS FOR NOVEL DRUG DISCOVERY', *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 19(6). DOI: 10.3390/IJMS19061578.

TOMIĆ, K. *ET AL.* (2018) 'COMPLETE RESPONSE OF METASTATIC MELANOMA TO SECOND LINE CHEMOTHERAPY WITH PACLITAXEL AND CARBOPLATIN - CASE REPORT', *ACTA MEDICA ACADEMICA*, 47(1), PP. 82–87.

TONÉ, S. *ET AL.* (2007) 'THREE DISTINCT STAGES OF APOPTOTIC NUCLEAR CONDENSATION REVEALED BY TIME-LAPSE IMAGING, BIOCHEMICAL AND ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS OF CELL-FREE APOPTOSIS', *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH*, PP. 3635–3644. DOI: 10.1016/J.YEXCR.2007.06.018.

TOUAB, M. *ET AL.* (2002) 'VERSICAM IS DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN HUMAN MELANOMA AND MAY PLAY A ROLE IN TUMOR DEVELOPMENT', *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 160(2), PP. 549–557.

UEDA, Y. AND RICHMOND, A. (2006) 'NF-KAPPAB ACTIVATION IN MELANOMA', *PIGMENT CELL RESEARCH*, PP. 112–124. DOI: 10.1111/J.1600-0749.2006.00304.X.

- USOLTSEVA, R. V. *ET AL.* (2018) 'STRUCTURAL CHARACTERISTICS AND ANTICANCER ACTIVITY IN VITRO OF FUCOIDAN FROM BROWN ALGA PADINA BORYANA', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 184, PP. 260–268.
- VALENTA, T., HAUSMANN, G. AND BASLER, K. (2012) 'THE MANY FACES AND FUNCTIONS OF B-CATENIN', *THE EMBO JOURNAL*, 31(12), PP. 2714–2736.
- VARTANIAN, A. *ET AL.* (2011) 'VEGFR1 AND PKCA SIGNALING CONTROL MELANOMA VASCULOGENIC MIMICRY IN A VEGFR2 KINASE-INDEPENDENT MANNER', *MELANOMA RESEARCH*, PP. 91–98. DOI: 10.1097/CMR.0b013e328343a237.
- VARTANIAN, A. *ET AL.* (2016) 'MELANOMA EDUCATES MESENCHYMAL STROMAL CELLS TOWARDS VASCULOGENIC MIMICRY', *ONCOLOGY LETTERS*, 11(6), PP. 4264–4268.
- VENKATESAN, J., ANIL, S. AND KIM, S.-K. (2017) *SEAWEED POLYSACCHARIDES: ISOLATION, BIOLOGICAL AND BIOMEDICAL APPLICATIONS*. ELSEVIER.
- VISHCHUK, O. S. *ET AL.* (2016) 'PDZ-BINDING KINASE/T-LAK CELL-ORIGINATED PROTEIN KINASE IS A TARGET OF THE FUCOIDAN FROM BROWN ALGA FUCUS EVANESCENS IN THE PREVENTION OF EGF-INDUCED NEOPLASTIC CELL TRANSFORMATION AND COLON CANCER GROWTH', *ONCOTARGET*, 7(14), PP. 18763–18773.
- VLAD-FIEGEN, A. *ET AL.* (2012) 'THE WNT PATHWAY DESTABILIZES ADHERENS JUNCTIONS AND PROMOTES CELL MIGRATION VIA B-CATENIN AND ITS TARGET GENE CYCLIN D1', *FEBS OPEN BIO*, 2, PP. 26–31.
- VULTUR, A. AND HERLYN, M. (2013) 'SNAPSHOT: MELANOMA', *CANCER CELL*, PP. 706–706.E1. DOI: 10.1016/J.CCR.2013.05.001.
- WANG, F. *ET AL.* (2017) 'CRUDE FUCOIDAN EXTRACTS IMPAIR ANGIOGENESIS IN MODELS RELEVANT FOR BONE REGENERATION AND OSTEOSARCOMA VIA REDUCTION OF VEGF AND SDF-1', *MARINE DRUGS*, 15(6). DOI: 10.3390/MD15060186.
- WANG, M. *ET AL.* (2019) 'POTENTIAL MECHANISMS OF ACTION OF CURCUMIN FOR CANCER PREVENTION: FOCUS ON CELLULAR SIGNALING PATHWAYS AND MIRNAS', *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES*, 15(6), PP. 1200–1214.
- WANG, P. *ET AL.* (2014) 'ANTI-METASTASIS EFFECT OF FUCOIDAN FROM UNDARIA PINNATIFIDA SPOROPHYLLS IN MOUSE HEPATOCARCINOMA Hca-F CELLS', *PLOS ONE*, 9(8), P. E106071.
- WANG, X. *ET AL.* (2019) 'ABERRANT EXPRESSION OF VASCULOGENIC MIMICRY, PRRX1, AND CIP2A IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA AND ITS CLINICOPATHOLOGICAL SIGNIFICANCE', *MEDICINE*, P. E17028. DOI: 10.1097/MD.00000000000017028.
- WANG, Y. *ET AL.* (2019) 'BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FUCOIDAN AND THE FACTORS MEDIATING ITS THERAPEUTIC EFFECTS: A REVIEW OF RECENT STUDIES', *MARINE DRUGS*, 17(3). DOI: 10.3390/MD17030183.
- VAN WEELDEN, G. *ET AL.* (2019) 'FUCOIDAN STRUCTURE AND ACTIVITY IN RELATION TO ANTI-CANCER MECHANISMS', *MARINE DRUGS*, 17(1). DOI: 10.3390/MD17010032.
- WEINBERG AND A., R. (2013) *THE BIOLOGY OF CANCER: SECOND INTERNATIONAL STUDENT EDITION*. W.W. NORTON & COMPANY.
- WILSON, M. A. AND SCHUCHTER, L. M. (2016) 'CHEMOTHERAPY FOR MELANOMA', *CANCER TREATMENT AND RESEARCH*, 167, PP. 209–229.
- WRIGHT, C. J. M. AND MCCORMACK, P. L. (2013) 'TRAMETINIB: FIRST GLOBAL APPROVAL', *DRUGS*, PP. 1245–1254. DOI: 10.1007/s40265-013-0096-1.
- WU, L. *ET AL.* (2016) 'A REVIEW ABOUT THE DEVELOPMENT OF FUCOIDAN IN ANTITUMOR ACTIVITY: PROGRESS AND CHALLENGES', *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 154, PP. 96–111.
- WU, S.-Y. *ET AL.* (2016) 'BROWN SEAWEED FUCOIDAN INHIBITS CANCER PROGRESSION BY DUAL REGULATION OF MIR-29C/ADAM12 AND MIR-17-5P/PTEN AXES IN HUMAN BREAST CANCER CELLS', *JOURNAL OF CANCER*, 7(15), PP. 2408–2419.

- XUE, M. *ET AL.* (2012) 'ANTICANCER PROPERTIES AND MECHANISMS OF FUCOIDAN ON MOUSE BREAST CANCER IN VITRO AND IN VIVO', *PLOS ONE*, 7(8), P. E43483.
- YANG, A. S. AND CHAPMAN, P. B. (2009) 'THE HISTORY AND FUTURE OF CHEMOTHERAPY FOR MELANOMA', *HEMATOLOGY/ONCOLOGY CLINICS OF NORTH AMERICA*, PP. 583–597. DOI: 10.1016/J.HOC.2009.03.006.
- YANG, G. *ET AL.* (2015) 'ANTITUMOR ACTIVITY OF FUCOIDAN AGAINST DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA IN VITRO AND IN VIVO', *ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA*, 47(11), PP. 925–931.
- YANG, L. *ET AL.* (2013) 'FUCOIDAN DERIVED FROM UNDARIA PINNATIFIDA INDUCES APOPTOSIS IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA SMMC-7721 CELLS VIA THE ROS-MEDIATED MITOCHONDRIAL PATHWAY', *MARINE DRUGS*, 11(6), PP. 1961–1976.
- YANG, P., BU, P. AND LI, C. (2017) 'MIR-124 INHIBITS PROLIFERATION, MIGRATION AND INVASION OF MALIGNANT MELANOMA CELLS VIA TARGETING VERSICAM', *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*, 14(4), PP. 3555–3562.
- YAN, M.-D. *ET AL.* (2015) 'FUCOIDAN ELEVATES MICRORNA-29B TO REGULATE DNMT3B-MTSS1 AXIS AND INHIBIT EMT IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS', *MARINE DRUGS*, 13(10), PP. 6099–6116.
- YE, J. *ET AL.* (2005) 'ENZYME-DIGESTED FUCOIDAN EXTRACTS DERIVED FROM SEAWEED MOZUKU OF CLADOSIPHON NOVAE-CALEDONIAE KYLIN INHIBIT INVASION AND ANGIOGENESIS OF TUMOR CELLS', *CYTOTECHNOLOGY*, PP. 117–126. DOI: 10.1007/s10616-005-3761-8.
- ZHANG, J. *ET AL.* (2016) 'A FUCUS VESICULOSUS EXTRACT INHIBITS ESTROGEN RECEPTOR ACTIVATION AND INDUCES CELL DEATH IN FEMALE CANCER CELL LINES', *BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE*, 16, P. 151.
- ZHANG, X. (2011) 'ABSTRACT 3434: THROMBOXANE A2 RECEPTOR BETA IS INDUCED BY THE EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION OF BREAST CANCER CELLS AND CONTRIBUTES TO BREAST CANCER MOTILITY AND METASTASIS', *TUMOR BIOLOGY*. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2011-3434.
- ZHANG, Z. *ET AL.* (2013) 'FUCOIDAN EXTRACT ENHANCES THE ANTI-CANCER ACTIVITY OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS IN MDA-MB-231 AND MCF-7 BREAST CANCER CELLS', *MARINE DRUGS*, 11(1), PP. 81–98.
- ZHANG, Z. *ET AL.* (2019) 'THE ROLE OF VASCULAR MIMICRY AS A BIOMARKER IN MALIGNANT MELANOMA: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS', *BMC CANCER*, 19(1), P. 1134.
- ZHAN, T., RINDTORFF, N. AND BOUTROS, M. (2017) 'WNT SIGNALING IN CANCER', *ONCOGENE*, PP. 1461–1473. DOI: 10.1038/ONC.2016.304.
- ZHOU, L., YANG, K., WICKETT, R. R., *ET AL.* (2016) 'TARGETED DEACTIVATION OF CANCER-ASSOCIATED FIBROBLASTS BY B-CATENIN ABLATION SUPPRESSES MELANOMA GROWTH', *TUMOUR BIOLOGY: THE JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ONCODEVELOPMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 37(10), PP. 14235–14248.
- ZHURISHKINA, E. V. *ET AL.* (2017) 'A COMPARISON OF THE EFFECT OF FUCOIDAN FROM ALGA FUCUS VESICULOSUS AND ITS FRACTIONS OBTAINED BY ANION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY ON HELA G-63, HEP G2, AND CHANG LIVER CELLS', *CELL AND TISSUE BIOLOGY*, PP. 242–249. DOI: 10.1134/s1990519x17030117.
- ZHURISHKINA, E. V. *ET AL.* (2020) 'THE EFFECT OF POLYDISPERSE FUCOIDANS FROM FUCUS VESICULOSUS ON HEP G2 AND CHANG LIVER CELLS', *BIOACTIVE CARBOHYDRATES AND DIETARY FIBRE*, 21, P. 100209.
- ZÖLLER, M. (2011) 'CD44: CAN A CANCER-INITIATING CELL PROFIT FROM AN ABUNDANTLY EXPRESSED MOLECULE?', *NATURE REVIEWS. CANCER*, 11(4), PP. 254–267.

Anexo 1

DADOS RT-qPCR DA CHL-1 APÓS TRATAMENTO COM A FUCANA A (72h, 100 ug/mL)

Gene	Ct Veic Exp1	Ct Veic Exp2	Ct Veic Exp3	Ct FucA Exp1	Ct FucA Exp2	Ct FucA Exp3	Fold regulation	p-value
ADAMTS1	22.931	22.934	21.935	22.950	21.912	21.912	1.27	0.515747
ADAMTS1 3	26.978	27.966	26.941	25.952	27.993	26.953	1.26	0.522560
ADAMTS8	26.909	26.915	26.890	25.903	26.898	26.897	1.27	0.365714
CD44	21.953	21.918	20.926	20.920	20.918	20.934	1.60	0.124703
CDH1	28.936	26.916	27.912	26.929	27.917	27.922	1.26	0.776410
CLEC3B	27.962	26.923	26.920	25.929	27.939	27.960	-1.00	0.774286
CNTN1	23.947	23.924	23.909	23.923	23.941	24.955	-1.27	0.370612
COL11A1	16.934	16.904	16.947	17.939	16.934	17.969	-1.61	0.115034
COL12A1	25.926	26.928	26.935	25.934	26.927	26.936	1.00	0.999452
COL14A1	19.945	20.960	20.971	19.947	19.932	20.947	1.28	0.500687
COL15A1	19.947	19.920	20.939	18.923	18.913	20.951	1.60	0.270059
COL16A1	22.930	23.926	24.978	21.930	21.921	22.923	3.22	0.052216
COL1A1	27.942	27.947	27.956	26.950	27.933	27.961	1.26	0.370571
COL4A2	19.941	19.938	18.933	19.978	19.955	19.965	-1.28	0.362315
COL5A1	22.956	23.961	23.967	23.968	23.972	23.977	-1.27	0.366652
COL6A1	19.923	20.948	20.962	19.956	19.924	20.969	1.26	0.531435
COL6A2	20.953	21.957	21.962	22.978	20.959	23.987	-2.02	0.549526
COL7A1	27.954	26.941	26.941	25.934	27.957	26.959	1.26	0.523852
COL8A1	28.967	27.949	27.915	26.949	28.970	30.977	-1.61	0.958144
CTGF	28.940	28.970	27.941	26.931	27.924	30.981	1.01	0.538852
CTNNA1	17.949	18.985	17.957	17.952	17.953	18.986	1.00	0.999868
CTNNB1	18.937	22.963	19.959	19.980	19.957	25.973	-2.54	0.579673
CTNND1	21.965	26.992	22.963	21.970	21.982	35.966	-5.07	0.743905
CTNND2	28.959	36.988	36.015	26.968	27.937	Und	8.11	0.233864
ECM1	22.932	23.941	21.929	23.943	23.937	22.926	-1.59	0.354565
FN1	24.927	25.953	24.931	24.944	25.972	24.938	-1.01	0.975286
HAS1	28.917	27.913	28.935	26.902	28.917	27.916	1.60	0.343923

ICAM1	27.937	26.906	26.901	25.914	27.926	26.911	1.26	0.523605
ITGA1	24.924	24.909	23.905	23.910	23.917	23.925	1.59	0.133005
ITGA2	22.909	23.913	22.911	22.924	22.915	22.918	1.26	0.399262
ITGA3	27.943	26.924	26.899	25.928	27.933	26.917	1.26	0.524347
ITGA4	22.919	23.933	22.918	23.936	23.929	23.955	-1.60	0.118960
ITGA5	27.911	26.915	27.918	26.934	28.934	27.926	-1.27	0.764161
ITGA6	19.934	20.953	19.949	19.948	19.930	19.958	1.26	0.389690
ITGA7	23.908	24.913	22.914	23.902	23.908	22.914	1.27	0.782633
ITGA8	28.908	27.917	28.938	26.914	28.925	28.938	1.26	0.560018
ITGAL	27.951	26.934	26.921	25.933	27.939	26.946	1.26	0.524878
ITGAM	28.921	27.937	27.913	26.936	28.941	27.937	1.25	0.527669
ITGAV	19.925	20.948	19.934	19.962	19.930	19.954	1.25	0.416639
ITGB1	19.937	20.953	19.965	19.952	19.938	20.960	1.00	0.994082
ITGB2	27.933	26.935	26.907	25.918	27.923	27.958	-1.00	0.770878
ITGB3	24.900	24.917	24.908	24.913	25.947	25.931	-1.61	0.115144
ITGB4	21.925	21.934	22.940	20.916	20.919	21.940	2.01	0.088933
ITGB5	21.938	22.948	21.928	21.961	21.963	22.954	-1.01	0.955465
ANOS1	28.912	32.972	28.934	26.924	28.923	29.941	3.20	0.372270
LAMA1	29.930	36.981	29.934	27.917	30.942	34.973	1.27	0.553480
LAMA2	24.901	31.972	26.942	24.929	25.961	28.965	2.50	0.830918
LAMA3	23.970	35.979	26.950	22.913	22.926	26.970	20.72	0.219127
LAMB1	19.920	20.924	19.912	19.926	19.926	19.917	1.26	0.394527
LAMB3	27.931	26.920	27.927	25.923	27.933	27.940	1.26	0.561279
LAMC1	19.919	20.931	19.924	19.923	19.917	19.921	1.27	0.379237
MMP1	28.922	27.910	28.935	26.921	28.917	28.947	1.26	0.562677
MMP10	27.926	27.923	27.913	26.924	28.926	27.923	-1.00	0.725734
MMP11	22.942	22.921	23.924	22.942	22.935	23.937	-1.00	0.997418
MMP12	29.935	28.922	28.926	27.926	29.923	29.951	-1.00	0.770762
MMP13	29.955	27.928	28.928	27.942	29.951	28.935	-1.00	0.997072
MMP14	19.940	19.925	19.963	19.948	19.925	19.955	1.00	0.794829
MMP15	22.945	22.936	22.953	22.951	22.946	22.957	-1.00	0.584469
MMP16	21.936	22.955	21.972	21.939	21.923	21.964	1.27	0.361713
MMP2	22.917	22.909	21.912	22.906	22.909	21.918	1.00	0.995779
MMP3	28.944	27.935	28.956	26.937	28.932	28.965	1.26	0.558692
MMP7	31.962	28.948	28.927	27.937	29.933	28.935	2.02	0.433171

MMP8	28.925	27.923	28.962	26.928	28.927	28.965	1.26	0.561113
MMP9	28.923	28.950	28.955	27.943	28.925	28.952	1.26	0.367584
NCAM1	27.925	27.944	27.916	26.930	27.923	28.958	-1.00	0.727099
PECAM1	30.915	32.944	30.910	28.916	30.921	31.924	2.01	0.390566
SELE	26.955	26.980	26.964	24.949	26.945	26.960	1.61	0.369163
SELL	26.972	27.957	25.943	24.953	26.957	27.969	1.26	0.607477
SELP	27.950	26.965	27.952	26.973	27.955	27.964	-1.00	0.997169
SGCE	22.940	36.972	22.946	21.945	21.936	30.998	4.01	0.420839
SPARC	19.953	20.976	18.944	19.956	19.952	19.966	1.00	0.719637
SPG7	21.962	32.001	21.982	21.949	21.968	22.977	8.11	0.673867
SPP1	28.945	27.929	27.919	26.953	28.943	27.927	1.25	0.526462
TGFBI	21.928	21.911	22.944	22.938	23.960	22.941	-2.02	0.086768
THBS1	26.962	26.962	25.978	25.978	26.981	25.982	1.25	0.536776
THBS2	27.942	26.917	27.931	25.921	27.919	27.927	1.27	0.555507
THBS3	23.928	25.923	24.919	23.918	24.936	24.942	1.25	0.780620
TIMP1	19.939	20.955	19.932	19.964	19.938	20.962	-1.01	0.974937
TIMP2	17.941	17.907	17.913	17.949	17.935	17.932	-1.01	0.381413
TIMP3	27.932	26.902	27.917	26.955	28.941	27.930	-1.28	0.747260
TNC	28.910	27.905	27.903	26.913	28.901	27.911	1.26	0.520601
VCAM1	27.928	26.920	27.921	26.940	27.922	28.949	-1.27	0.767696
VCAN	27.938	28.957	27.944	29.963	28.948	28.944	-2.00	0.094189
VTN	24.924	24.915	25.959	24.944	24.928	25.952	-1.00	0.990996
ACTB	13.94145	14.97548	13.97169	14.96715	13.96005	14.98866	-1.27	0.518443
B2M	20.97554	19.94425	18.94905	18.93990	18.95677	18.94853	2.01	0.139124
GAPDH	15.98099	15.94137	14.93959	15.95504	15.94715	15.96684	-1.26	0.388832
HPRT1	21.92689	21.91782	21.95210	21.93506	21.93578	21.93411	1.00	1.000000
RPLP0	16.93645	17.94442	17.94781	16.95038	16.94598	16.93180	1.59	0.115209

Legenda: Und = undetermined

Anexo 2

Análises de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos na linhagem CHL-1 após tratamento com a Fucana A (100 µg/mL, 72h)

GENES COM EXPRESSÃO DIMINUÍDA

Tabela 1. Gene Ontology (GO) Biological Process

term ID	term description	false discovery rate	genes
GO:0030198	extracellular matrix organization	1.26e-10	CDH1,COL11A1,COL6A2,COL8A1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3,TGFBI,VCAN
GO:0007155	cell adhesion	2.07e-10	APC,CDH1,COL6A2,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3,TGFBI,VCAN
GO:0001704	formation of primary germ layer	4.26e-06	COL11A1,COL8A1,CTNNB1,ITGA4,ITGB3
GO:0035987	endodermal cell differentiation	4.26e-06	COL11A1,COL8A1,CTNNB1,ITGA4
GO:0071681	cellular response to indole-3-methanol	4.26e-06	CDH1,CTNNA1,CTNNB1
GO:0098609	cell-cell adhesion	3.19e-05	CDH1,CTNNA1,CTNNB1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0016043	cellular component organization	3.46e-05	APC,CDH1,COL11A1,COL6A2,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3,TGFBI,VCAN
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	6.31e-05	COL11A1,COL8A1,CTNNB1,ECM1,ITGA4,ITGB3,TGFBI
GO:0001525	angiogenesis	0.00012	COL8A1,CTNNB1,ECM1,ITGB3,TGFBI
GO:0007160	cell-matrix adhesion	0.00012	CTNNB1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	0.00012	COL11A1,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA4,ITGB3,TGFBI
GO:0045216	cell-cell junction organization	0.00036	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1
GO:0050679	positive regulation of epithelial cell proliferation	0.00043	CTNNB1,ECM1,ITGA4,ITGB3

GO:0048731	system development	0.00045	CDH1,COL11A1,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA4,ITGB3,TGFBI,VCAN
GO:0016477	cell migration	0.00061	APC,CTNNB1,FYN,ITGA4,ITGB3,VCAN
GO:0032879	regulation of localization	0.00061	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0072359	circulatory system development	0.00061	COL11A1,COL8A1,CTNNB1,ECM1,ITGB3,TGFBI
GO:2000145	regulation of cell motility	0.00061	APC,CTNNA1,ECM1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0030154	cell differentiation	0.00070	CDH1,COL11A1,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4,ITGB3,TGFBI,VCAN
GO:0071417	cellular response to organonitrogen compound	0.00072	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN
GO:0097305	response to alcohol	0.00075	CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN
GO:0034332	adherens junction organization	0.00076	CDH1,CTNNA1,CTNNB1
GO:0035635	entry of bacterium into host cell	0.00076	CDH1,CTNNB1
GO:0001938	positive regulation of endothelial cell proliferation	0.0010	ECM1,ITGA4,ITGB3
GO:0048468	cell development	0.0010	CDH1,COL11A1,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4,ITGB3
GO:0048513	animal organ development	0.0011	CDH1,COL11A1,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA4,TGFBI
GO:0009888	tissue development	0.0014	COL11A1,COL8A1,CTNNB1,ECM1,ITGA4,ITGB3,TGFBI
GO:0030155	regulation of cell adhesion	0.0014	CDH1,COL8A1,FYN,ITGA4,TGFBI
GO:0030260	entry into host cell	0.0014	CDH1,CTNNB1,ITGB3
GO:0031175	neuron projection development	0.0014	CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4
GO:0035690	cellular response to drug	0.0014	CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN
GO:0042127	regulation of cell population proliferation	0.0014	APC,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA4,ITGB3

GO:0010942	positive regulation of cell death	0.0016	APC,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4
GO:0030168	platelet activation	0.0018	FYN,ITGA2B,ITGB3
GO:0032501	multicellular organismal process	0.0018	CDH1,COL11A1,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3,TGFB1,VCAN
GO:0002576	platelet degranulation	0.0022	ECM1,ITGA2B,ITGB3
GO:0034329	cell junction assembly	0.0024	APC,CTNNA1,CTNNB1
GO:1904886	beta-catenin destruction complex disassembly	0.0024	APC,CTNNB1
GO:0030334	regulation of cell migration	0.0025	APC,ECM1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0070527	platelet aggregation	0.0031	ITGA2B,ITGB3
GO:0050974	detection of mechanical stimulus involved in sensory perception	0.0033	COL11A1,FYN
GO:1902692	regulation of neuroblast proliferation	0.0035	CTNNA1,CTNNB1
GO:0034113	heterotypic cell-cell adhesion	0.0039	ITGA4,ITGB3
GO:0030335	positive regulation of cell migration	0.0042	APC,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0001501	skeletal system development	0.0043	COL11A1,CTNNB1,TGFB1,VCAN
GO:0002685	regulation of leukocyte migration	0.0043	ECM1,ITGA2B,ITGA4
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	0.0045	APC,CDH1,COL6A2,CTNNA1,CTNNB1,FYN
GO:1903827	regulation of cellular protein localization	0.0045	APC,CDH1,CTNNB1,FYN
GO:0090279	regulation of calcium ion import	0.0046	CTNNB1,FYN
GO:1901701	cellular response to oxygen-containing compound	0.0046	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN
GO:2000404	regulation of T cell migration	0.0046	ECM1,ITGA4

GO:0050808	synapse organization	0.0047	CDH1,CTNNB1,FYN
GO:0000904	cell morphogenesis involved in differentiation	0.0052	CTNNB1,FYN,ITGA4,ITGB3
GO:0008347	glial cell migration	0.0052	CTNNB1,VCAN
GO:0034446	substrate adhesion-dependent cell spreading	0.0052	ITGA4,ITGB3
GO:2001240	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	0.0052	CTNNA1,FYN
GO:0022008	neurogenesis	0.0053	CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4,VCAN
GO:0043297	apical junction assembly	0.0058	APC,CTNNA1
GO:2001234	negative regulation of apoptotic signaling pathway	0.0063	CTNNA1,CTNNB1,FYN
GO:1903202	negative regulation of oxidative stress-induced cell death	0.0064	CTNNB1,FYN
GO:0009611	response to wounding	0.0065	CTNNA1,FYN,ITGA2B,ITGB3
GO:0001775	cell activation	0.0068	CTNNB1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0050896	response to stimulus	0.0075	APC,CDH1,COL11A1,COL6A2,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3,TGFB1
GO:0051179	localization	0.0076	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3,VCAN
GO:0051248	negative regulation of protein metabolic process	0.0080	APC,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGB3
GO:0090596	sensory organ morphogenesis	0.0081	COL11A1,COL8A1,CTNNB1
GO:0016192	vesicle-mediated transport	0.0083	CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0043065	positive regulation of apoptotic process	0.0084	APC,CTNNA1,CTNNB1,ITGA4
GO:0002062	chondrocyte differentiation	0.0098	COL11A1,TGFB1
GO:1990138	neuron projection extension	0.0098	CTNNB1,ITGA4

GO:0048518	positive regulation of biological process	0.0099	APC,CDH1,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0009968	negative regulation of signal transduction	0.0103	APC,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN
GO:0044403	symbiont process	0.0103	CDH1,CTNNB1,FYN,ITGB3
GO:1903829	positive regulation of cellular protein localization	0.0111	APC,CDH1,FYN
GO:0008283	cell population proliferation	0.0113	COL8A1,CTNNB1,FYN,TGFB1
GO:0048010	vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	0.0113	FYN,ITGB3
GO:0050900	leukocyte migration	0.0116	FYN,ITGA4,ITGB3
GO:1900182	positive regulation of protein localization to nucleus	0.0116	CDH1,FYN
GO:0021675	nerve development	0.0125	CTNNB1,ITGA4
GO:0033045	regulation of sister chromatid segregation	0.0133	APC,CTNNB1
GO:0042475	odontogenesis of dentin-containing tooth	0.0138	CTNNA1,CTNNB1
GO:1903321	negative regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	0.0147	CTNNB1,FYN
GO:0006029	proteoglycan metabolic process	0.0149	COL11A1,VCAN
GO:0010033	response to organic substance	0.0158	APC,CDH1,COL6A2,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4
GO:0051149	positive regulation of muscle cell differentiation	0.0158	CTNNA1,CTNNB1
GO:1901216	positive regulation of neuron death	0.0158	CTNNB1,FYN
GO:0046649	lymphocyte activation	0.0172	CTNNB1,FYN,ITGA4
GO:0048704	embryonic skeletal system morphogenesis	0.0176	COL11A1,CTNNB1

GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	0.0180	CDH1,FYN,ITGA4
GO:0030900	forebrain development	0.0180	CDH1,CTNNB1,FYN
GO:0002682	regulation of immune system process	0.0182	CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4
GO:0048522	positive regulation of cellular process	0.0187	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	0.0188	COL8A1,FYN,ITGA4
GO:0061564	axon development	0.0188	CTNNA1,FYN,ITGA4
GO:0007417	central nervous system development	0.0216	CDH1,CTNNB1,FYN,VCAN
GO:0009887	animal organ morphogenesis	0.0218	COL11A1,COL8A1,CTNNA1,CTNNB1
GO:0048593	camera-type eye morphogenesis	0.0223	COL8A1,CTNNB1
GO:0071310	cellular response to organic substance	0.0225	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4
GO:0042981	regulation of apoptotic process	0.0230	APC,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4
GO:0001764	neuron migration	0.0243	CTNNB1,FYN
GO:0051093	negative regulation of developmental process	0.0243	CTNNA1,CTNNB1,ECM1,ITGB3
GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	0.0255	CTNNB1,FYN
GO:0042221	response to chemical	0.0261	APC,CDH1,COL6A2,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA4,ITGB3
GO:0048812	neuron projection morphogenesis	0.0265	CTNNB1,FYN,ITGA4
GO:0051291	protein heterooligomerization	0.0265	COL6A2,CTNNA1
GO:0090316	positive regulation of intracellular protein transport	0.0265	CDH1,FYN
GO:0002687	positive regulation of leukocyte migration	0.0266	ITGA2B,ITGA4

GO:0051338	regulation of transferase activity	0.0279	APC,CTNNB1,FYN,ITGB3
GO:0050793	regulation of developmental process	0.0304	CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B,ITGB3
GO:0032269	negative regulation of cellular protein metabolic process	0.0326	APC,CTNNB1,ECM1,FYN
GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	0.0333	APC,FYN,ITGB3
GO:0045595	regulation of cell differentiation	0.0336	CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA2B,ITGB3
GO:0006897	endocytosis	0.0346	FYN,ITGA4,ITGB3
GO:0051259	protein complex oligomerization	0.0348	APC,COL6A2,CTNNA1
GO:0046661	male sex differentiation	0.0355	CTNNA1,CTNNB1
GO:0048729	tissue morphogenesis	0.0362	COL11A1,CTNNB1,ITGB3
GO:0048523	negative regulation of cellular process	0.0365	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGB3,TGFBI
GO:0043933	protein-containing complex subunit organization	0.0386	APC,COL11A1,COL6A2,CTNNA1,CTNNB1
GO:0070507	regulation of microtubule cytoskeleton organization	0.0441	APC,CTNNB1
GO:0050731	positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	0.0454	FYN,ITGB3
GO:0030278	regulation of ossification	0.0455	CTNNB1,ECM1
GO:0006909	phagocytosis	0.0472	FYN,ITGB3
GO:0032870	cellular response to hormone stimulus	0.0472	APC,CTNNB1,FYN
GO:2000026	regulation of multicellular organismal development	0.0475	CTNNA1,CTNNB1,ECM1,FYN,ITGA2B
GO:0031400	negative regulation of protein modification process	0.0481	APC,CTNNB1,FYN

GO:1901215	negative regulation of neuron death	0.0493	CTNNB1,FYN
------------	-------------------------------------	--------	------------

Tabela 2. KEGG Pathways

term ID	term description	false discovery rate	genes
hsa05412	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	8.83e-08	CTNNA1,CTNNB1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
hsa04510	Focal adhesion	8.89e-08	COL6A2,CTNNB1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
hsa05165	Human papillomavirus infection	9.48e-07	APC,COL6A2,CTNNB1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
hsa05213	Endometrial cancer	1.22e-06	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1
hsa04520	Adherens junction	2.12e-06	CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN
hsa04512	ECM-receptor interaction	2.94e-06	COL6A2,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
hsa04390	Hippo signaling pathway	2.52e-05	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1
hsa05226	Gastric cancer	2.52e-05	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1
hsa05130	Pathogenic Escherichia coli infection	4.82e-05	CDH1,CTNNB1,FYN
hsa04015	Rap1 signaling pathway	6.15e-05	CDH1,CTNNB1,ITGA2B,ITGB3
hsa04810	Regulation of actin cytoskeleton	6.15e-05	APC,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
hsa05100	Bacterial invasion of epithelial cells	8.74e-05	CDH1,CTNNA1,CTNNB1
hsa05200	Pathways in cancer	9.00e-05	APC,CDH1,CTNNA1,CTNNB1,ITGA2B
hsa05410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	0.00011	ITGA2B,ITGA4,ITGB3
hsa05414	Dilated cardiomyopathy (DCM)	0.00012	ITGA2B,ITGA4,ITGB3

hsa04640	Hematopoietic cell lineage	0.00014	ITGA2B,ITGA4,ITGB3
hsa04670	Leukocyte transendothelial migration	0.00022	CTNNA1,CTNNB1,ITGA4
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	0.00027	COL6A2,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
hsa04611	Platelet activation	0.00027	FYN,ITGA2B,ITGB3
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	0.00031	CTNNB1,ITGA2B,ITGB3
hsa04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	0.00034	CDH1,ITGA4,VCAN
hsa05216	Thyroid cancer	0.00087	CDH1,CTNNB1
hsa05217	Basal cell carcinoma	0.0023	APC,CTNNB1
hsa05210	Colorectal cancer	0.0039	APC,CTNNB1
hsa04974	Protein digestion and absorption	0.0042	COL11A1,COL6A2
hsa04919	Thyroid hormone signaling pathway	0.0065	CTNNB1,ITGB3
hsa04380	Osteoclast differentiation	0.0072	FYN,ITGB3
hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.0086	APC,CTNNB1
hsa04310	Wnt signaling pathway	0.0089	APC,CTNNB1
hsa05206	MicroRNAs in cancer	0.0090	APC,ITGB3
hsa05224	Breast cancer	0.0090	APC,CTNNB1
hsa04934	Cushing's syndrome	0.0091	APC,CTNNB1
hsa05225	Hepatocellular carcinoma	0.0100	APC,CTNNB1
hsa05205	Proteoglycans in cancer	0.0137	CTNNB1,ITGB3

hsa05166	HTLV-I infection	0.0213	APC,CTNNB1
----------	------------------	--------	------------

Tabela 3. Reactome Pathways

term ID	term description	false discovery rate	genes
HSA-1474244	Extracellular matrix organization	1.60e-09	CDH1,COL11A1,COL6A2,COL8A1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3,VCAN
HSA-216083	Integrin cell surface interactions	1.93e-09	CDH1,COL6A2,COL8A1,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
HSA-3000178	ECM proteoglycans	1.41e-05	COL6A2,ITGA2B,ITGB3,VCAN
HSA-9006934	Signaling by Receptor Tyrosine Kinases	1.49e-05	COL11A1,COL6A2,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGB3
HSA-4420097	VEGFA-VEGFR2 Pathway	2.11e-05	CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGB3
HSA-5626467	RHO GTPases activate IQGAPs	3.63e-05	CDH1,CTNNA1,CTNNB1
HSA-1500931	Cell-Cell communication	4.05e-05	CDH1,CTNNA1,CTNNB1,FYN
HSA-418990	Adherens junctions interactions	4.05e-05	CDH1,CTNNA1,CTNNB1
HSA-111465	Apoptotic cleavage of cellular proteins	4.59e-05	APC,CDH1,CTNNB1
HSA-1474228	Degradation of the extracellular matrix	4.59e-05	CDH1,COL11A1,COL6A2,COL8A1
HSA-1643685	Disease	4.59e-05	APC,CDH1,CTNNB1,FYN,ITGA2B,ITGB3,VCAN
HSA-5663202	Diseases of signal transduction	5.23e-05	APC,CTNNB1,FYN,ITGA2B,ITGB3
HSA-8948216	Collagen chain trimerization	5.89e-05	COL11A1,COL6A2,COL8A1
HSA-2022090	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	0.00013	COL11A1,COL6A2,COL8A1
HSA-1442490	Collagen degradation	0.00014	COL11A1,COL6A2,COL8A1

HSA-162582	Signal Transduction	0.00014	APC,CDH1,COL11A1,COL6A2,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA2B,ITGB3
HSA-76002	Platelet activation, signaling and aggregation	0.00022	ECM1,FYN,ITGA2B,ITGB3
HSA-8876493	InIA-mediated entry of Listeria monocytogenes into host cells	0.00022	CDH1,CTNNB1
HSA-210990	PECAM1 interactions	0.00027	FYN,ITGB3
HSA-351906	Apoptotic cleavage of cell adhesion proteins	0.00027	CDH1,CTNNB1
HSA-109582	Hemostasis	0.00029	ECM1,FYN,ITGA2B,ITGA4,ITGB3
HSA-1266738	Developmental Biology	0.00029	COL6A2,CTNNA1,CTNNB1,FYN,ITGA2B,ITGB3
HSA-354194	GRB2:SOS provides linkage to MAPK signaling for Integrins	0.00030	ITGA2B,ITGB3
HSA-372708	p130Cas linkage to MAPK signaling for integrins	0.00034	ITGA2B,ITGB3
HSA-5339716	Misspliced GSK3beta mutants stabilize beta-catenin	0.00037	APC,CTNNB1
HSA-5358747	S33 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	0.00037	APC,CTNNB1
HSA-5358749	S37 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	0.00037	APC,CTNNB1
HSA-5358751	S45 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	0.00037	APC,CTNNB1
HSA-5358752	T41 mutants of beta-catenin aren't phosphorylated	0.00037	APC,CTNNB1
HSA-196299	Beta-catenin phosphorylation cascade	0.00039	APC,CTNNB1
HSA-114608	Platelet degranulation	0.00044	ECM1,ITGA2B,ITGB3
HSA-445144	Signal transduction by L1	0.00047	ITGA2B,ITGB3
HSA-202733	Cell surface interactions at the vascular wall	0.00050	FYN,ITGA4,ITGB3

HSA-5218920	VEGFR2 mediated vascular permeability	0.00075	CTNNA1,CTNNB1
HSA-375170	CDO in myogenesis	0.00077	CTNNA1,CTNNB1
HSA-4641262	Disassembly of the destruction complex and recruitment of AXIN to the membrane	0.00088	APC,CTNNB1
HSA-6802948	Signaling by high-kinase activity BRAF mutants	0.0011	ITGA2B,ITGB3
HSA-3769402	Deactivation of the beta-catenin transactivating complex	0.0013	APC,CTNNB1
HSA-5674135	MAP2K and MAPK activation	0.0013	ITGA2B,ITGB3
HSA-6802946	Signaling by moderate kinase activity BRAF mutants	0.0013	ITGA2B,ITGB3
HSA-6802955	Paradoxical activation of RAF signaling by kinase inactive BRAF	0.0013	ITGA2B,ITGB3
HSA-422475	Axon guidance	0.0015	COL6A2,FYN,ITGA2B,ITGB3
HSA-5673001	RAF/MAP kinase cascade	0.0016	FYN,ITGA2B,ITGB3
HSA-6802949	Signaling by RAS mutants	0.0019	ITGA2B,ITGB3
HSA-3000171	Non-integrin membrane-ECM interactions	0.0024	COL11A1,ITGB3
HSA-375165	NCAM signaling for neurite out-growth	0.0024	COL6A2,FYN
HSA-6802952	Signaling by BRAF and RAF fusions	0.0024	ITGA2B,ITGB3
HSA-8878159	Transcriptional regulation by RUNX3	0.0050	CTNNB1,ITGA4
HSA-5663205	Infectious disease	0.0051	CDH1,CTNNB1,FYN
HSA-198933	Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	0.0088	CDH1,ITGA4
HSA-1280218	Adaptive Immune System	0.0335	CDH1,FYN,ITGA4

GENES COM EXPRESSÃO AUMENTADA

Tabela 4. Gene Ontology (GO) Biological Process

term ID	term description	false discovery rate	genes
GO:0007155	cell adhesion	9.01e-10	CD44,COL15A1,COL16A1,HAS1,ITGA1,ITGA6,ITGB4,SELE,SELPLG,SPP1
GO:0030198	extracellular matrix organization	3.09e-08	CD44,COL16A1,HAS1,ITGA1,ITGA6,ITGB4,SPP1
GO:0031581	hemidesmosome assembly	1.01e-05	ITGA6,ITGB4,PLEC
GO:0007229	integrin-mediated signaling pathway	1.93e-05	COL16A1,ITGA1,ITGA6,ITGB4
GO:0050900	leukocyte migration	5.43e-05	CD44,ITGA1,ITGA6,SELE,SELPLG
GO:0007160	cell-matrix adhesion	5.57e-05	CD44,ITGA1,ITGA6,ITGB4
GO:0030212	hyaluronan metabolic process	7.30e-05	CD44,HAS1,HMMR
GO:0045123	cellular extravasation	7.30e-05	ITGA1,SELE,SELPLG
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	0.00019	CD44,SELE,SELPLG
GO:0048870	cell motility	0.00035	CD44,ITGA1,ITGA6,ITGB4,SELE,SELPLG
GO:0035878	nail development	0.00089	ITGA6,ITGB4
GO:0030214	hyaluronan catabolic process	0.0017	CD44,HMMR
GO:0033627	cell adhesion mediated by integrin	0.0018	COL16A1,ITGA6
GO:0050901	leukocyte tethering or rolling	0.0018	SELE,SELPLG
GO:0097186	amelogenesis	0.0020	ITGA6,ITGB4
GO:0098609	cell-cell adhesion	0.0021	CD44,ITGA6,SELE,SELPLG

GO:0051716	cellular response to stimulus	0.0071	CD44, COL15A1, COL16A1, HAS1, ITGA1, ITGA6, ITGB4, SELE, SELPLG, SPP1
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	0.0074	CD44, COL16A1, HAS1, ITGA1, ITGA6, SELPLG, SPP1
GO:0010033	response to organic substance	0.0100	CD44, COL16A1, HAS1, ITGA6, SELE, SELPLG, SPP1
GO:0042221	response to chemical	0.0156	CD44, COL16A1, HAS1, ITGA1, ITGA6, SELE, SELPLG, SPP1
GO:0071310	cellular response to organic substance	0.0181	CD44, COL16A1, HAS1, ITGA6, SELPLG, SPP1
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	0.0223	CD44, COL16A1, ITGA6
GO:0010811	positive regulation of cell-substrate adhesion	0.0320	COL16A1, ITGA6
GO:0048565	digestive tract development	0.0403	ITGA6, ITGB4
GO:0009056	catabolic process	0.0488	CD44, COL15A1, HMMR, ITGB4, SPP1
GO:0071495	cellular response to endogenous stimulus	0.0488	CD44, COL16A1, HAS1, SPP1

Tabela 5. KEGG Pathways

term ID	term description	false discovery rate	genes
hsa04512	ECM-receptor interaction	1.52e-10	CD44, HMMR, ITGA1, ITGA6, ITGB4, SPP1
hsa04510	Focal adhesion	6.51e-05	ITGA1, ITGA6, ITGB4, SPP1
hsa05412	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0.00010	ITGA1, ITGA6, ITGB4
hsa04640	Hematopoietic cell lineage	0.00011	CD44, ITGA1, ITGA6
hsa05410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	0.00011	ITGA1, ITGA6, ITGB4
hsa05414	Dilated cardiomyopathy (DCM)	0.00011	ITGA1, ITGA6, ITGB4

hsa05165	Human papillomavirus infection	0.00012	ITGA1,ITGA6,ITGB4,SPP1
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	0.00015	ITGA1,ITGA6,ITGB4,SPP1
hsa04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	0.00023	ITGA6,SELE,SELPLG
hsa04810	Regulation of actin cytoskeleton	0.00063	ITGA1,ITGA6,ITGB4

Tablela 6. Reactome Pathways

term ID	term description	false discovery rate	genes
HSA-1474244	Extracellular matrix organization	9.15e-11	CD44,COL15A1,COL16A1,ITGA1,ITGA6,ITGB4,PLEC,SPP1
HSA-1474290	Collagen formation	3.79e-08	COL15A1,COL16A1,ITGA6,ITGB4,PLEC
HSA-216083	Integrin cell surface interactions	3.79e-08	CD44,COL16A1,ITGA1,ITGA6,SPP1
HSA-2022090	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	7.56e-07	COL15A1,ITGA6,ITGB4,PLEC
HSA-446107	Type I hemidesmosome assembly	7.66e-07	ITGA6,ITGB4,PLEC
HSA-2142845	Hyaluronan metabolism	1.99e-06	CD44,HAS1,HMMR
HSA-3000157	Laminin interactions	8.14e-06	ITGA1,ITGA6,ITGB4
HSA-1474228	Degradation of the extracellular matrix	8.64e-06	CD44,COL15A1,COL16A1,SPP1
HSA-202733	Cell surface interactions at the vascular wall	8.64e-06	CD44,ITGA6,SELE,SELPLG
HSA-109582	Hemostasis	0.00011	CD44,ITGA1,ITGA6,SELE,SELPLG
HSA-2160916	Hyaluronan uptake and degradation	0.00016	CD44,HMMR
HSA-3000170	Syndecan interactions	0.00052	ITGA6,ITGB4

HSA-8948216	Collagen chain trimerization	0.0013	COL15A1,COL16A1
HSA-1442490	Collagen degradation	0.0023	COL15A1,COL16A1