

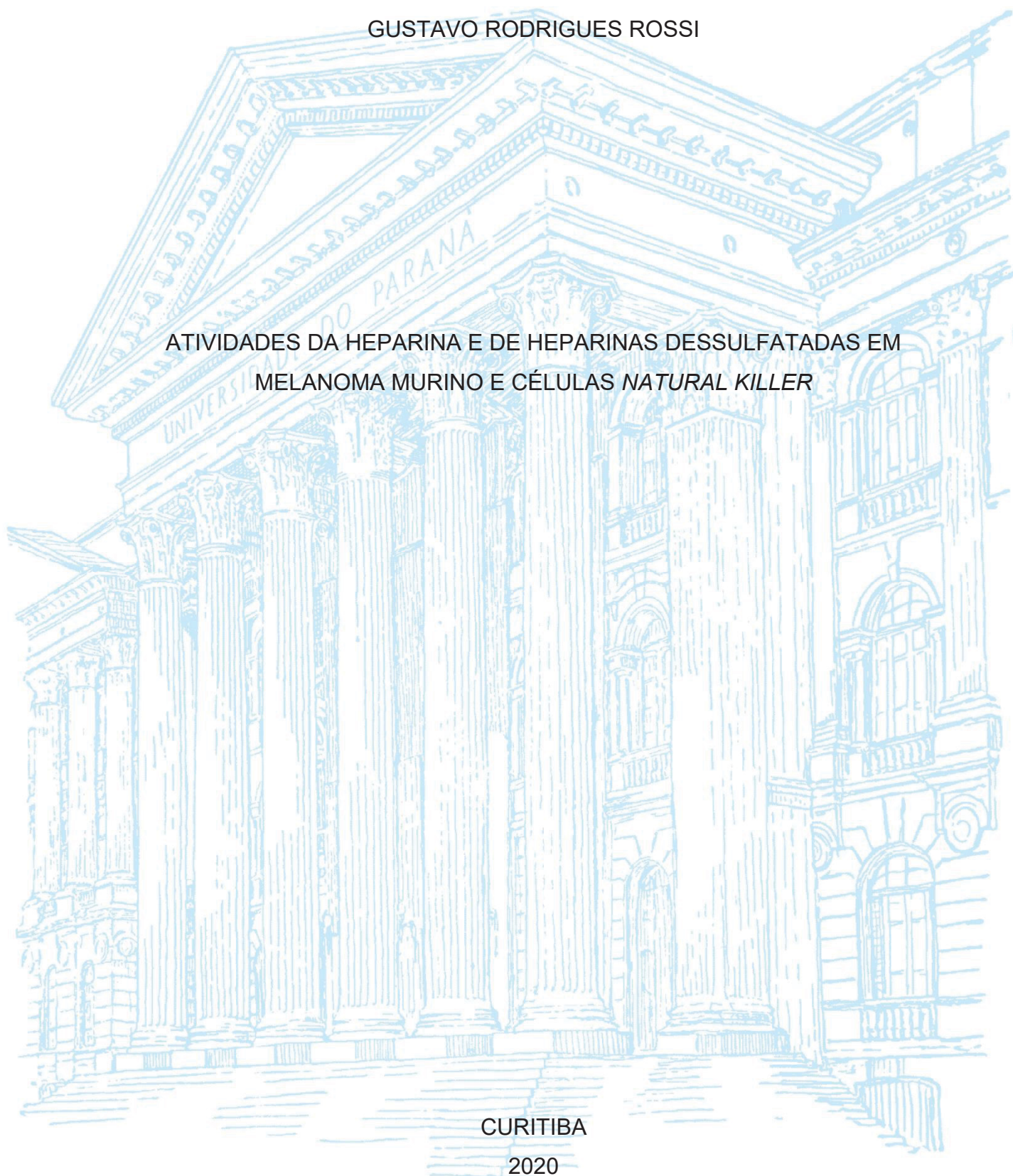
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO RODRIGUES ROSSI

ATIVIDADES DA HEPARINA E DE HEPARINAS DESSULFATADAS EM
MELANOMA MURINO E CÉLULAS *NATURAL KILLER*

CURITIBA

2020



GUSTAVO RODRIGUES ROSSI

ATIVIDADES DA HEPARINA E DE HEPARINAS DESSULFATADAS EM
MELANOMA MURINO E CÉLULAS *NATURAL KILLER*

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: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Fogagnoli Simas

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Rossi, Gustavo Rodrigues

Atividades de heparina e de heparinas dessulfatadas em melanoma murino e células *natural killer*. / Gustavo Rodrigues Rossi. – Curitiba, 2020. 67 p.: il.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade.

Coorientadora: Fernanda Fogagnoli Simas.

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

1. Câncer. 2. Melanoma. 3. Heparina. 4. Células killer. I. Título. II. Trindade, Edvaldo da Silva, 1971-. III. Simas, Fernanda Fogagnoli, 1979-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 614.5999477



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

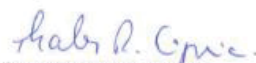
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GUSTAVO RODRIGUES ROSSI** intitulada: **ATIVIDADES DA HEPARINA E DE HEPARINAS DESSULFATADAS EM MELANOMA MURINO E CÉLULAS NATURAL KILLER**, sob orientação do Prof. Dr. EDVALDO DA SILVA TRINDADE, que após terem inquirido o aluno 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, 20 de Fevereiro de 2020.


EDVALDO DA SILVA TRINDADE
Presidente da Banca Examinadora




THALES RICARDO CIPRIANI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


LUCIANE REGINA CAVALLI
Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)


MAURO SÉRGIO GONÇALVES PAVÃO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

Digitally signed by Admin
DN: cn=Admin, o=Universidade
Federal do Rio de Janeiro, ou,
email=mpavao@hucf.ufjf.br,
c=BR
Date: 2020.03.03 10:25:09 -03'00'


SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHÖFER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Escrever uma tese muitas vezes é uma tarefa solitária. Mas, como tudo na vida, é impossível fazer sozinho e sem o apoio de pessoas especiais que merecem agradecimento!

À Jenifer, não existem palavras o suficiente para descrever o quanto sou grato a você. Obrigado por sempre estar do meu lado, discutindo ciência ou apenas deitados no sofá olhando para o teto. Você é a melhor pessoa eu que conheço e uma cientista excepcional!

Ao meu orientador (a mais de 10 anos) Prof. Dr. Edvaldo Trindade! Foram anos intensos de muito aprendizado, conversas e piadas! Ele é um exemplo de pesquisador e pessoa. Sua liderança é uma característica extraordinária, sempre pensando no bem maior e nunca em si próprio. Sei que ele se sente ausente por ter assumido a direção do setor, mas ele sempre estava lá quando precisava e nunca me senti abandonado!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fernanda Simas. A participação da Fer no meu doutorado foi essencial. O fato dela nunca estar convencida por completo, querer saber absolutamente todos os detalhes e sua maneira diferente de pensar e ver as coisas, fez com que eu saísse da minha zona de conforto.

Ao meu mentor, Dr. Fernando Guimarães, por sempre me passar bons conselhos para a minha vida acadêmica, e na reta final do meu doutorado me ajudou muito!

À Prof^a. Dr^a Carolina Camargo de Oliveira, por todo o seu apoio. A Caro sempre está disposta a ajudar e sempre contribui com comentários muito pertinentes.

Aos meus pais Fernando e Elisabete, por sempre incentivarem os meus estudos e me darem todo o suporte para o meu crescimento.

Ao Daniel (Dan), Odair e João por todas as nossas discussões sobre experimentos, artigos, filmes, séries e jogos. A convivência com vocês no laboratório sempre alegrava os meus dias.

À Dr^a Stelée Biscaia, por todo o companheirismo, ensinamentos e auxílio nos experimentos.

Ao pessoal do nosso laboratório que de alguma maneira contribuíram para essa tese, seja ajudando nos experimentos ou fazendo um café (Aline, Anderson, Maíra, Keila, Yasmin, Camila, Israel, Victória).

Ao Prof. Dr. Marcelo Lima e Prof^a Helena Nader e a Dr^a. Maria Cecília (Ciça) (UNIFESP), por todo seu apoio nas modificações químicas da heparina.

Ao Prof. Nicolas Huntington do “Molecular Immunology Lab” (Austrália) e todas as pessoas do seu laboratório por me receberem tão bem e auxiliarem nos experimentos.

À Universidade Federal do Paraná, foram 11 anos estudando nela. Tenho muito orgulho da minha formação aqui.

Ao Centro de Tecnologia Avançadas em Fluorescência da UFPR pelos microscópios.

Aos Biotérios do ICC (Instituto Carlos Chagas) e da UFPR pelo fornecimento e manutenção dos camundongos.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

À CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche (PDSE).

Ao CNPq e CAPES que financiaram esse projeto.

RESUMO

O melanoma é um dos tipos de câncer mais agressivos e metastáticos. Ele tem origem dos melanócitos, células produtoras de melanina na pele, que sofrem mutações e manipulam o microambiente em favor do seu desenvolvimento. Apesar da descoberta de novos tratamentos, o melanoma em estágios avançados ainda é de difícil tratamento, porque muitos tumores são resistentes aos tratamentos, e além disso, os tratamentos causam muitos efeitos colaterais. Enfatizando então a busca por novos compostos antimelanoma. Atualmente, novos tratamentos contra o câncer têm como foco melhorar a resposta imunológica contra células tumorais, principalmente de células T e *natural killer* (NK). As células NK são linfócitos inatos responsáveis pela eliminação de células infectadas ou transformadas. A ativação ou inibição das células NK é determinada pelo equilíbrio entre os ligantes nas células alvo e os receptores estimuladores ou inibidores na superfície das células NK. Um dos receptores estimuladores mais famosos é o NKp46, presente em quase todas as células NK. Atualmente, existe um grande interesse em encontrar ligantes para NKp46 para aumentar a citotoxicidade das células NK. Heparina é um polissacarídeo descrito como possíveis ligantes deste receptor. Além disso, é usada na clínica devido a sua ação anticoagulante. No entanto, a administração de heparina tem alguns efeitos colaterais (sangramento e trombocitopenia). Neste trabalho foram sintetizadas heparinas seletivamente dessulfatadas: N-dessulfatada (DNS), 6-O-dessulfatada (D6OS) e 2-O-dessulfatada (D2OS), todas elas com menor atividade anticoagulante que a heparina comercial. Foi avaliada a capacidade destas heparinas em alterar parâmetros malignos das células de melanoma murino B16-F10 e também os seus efeitos na ativação das células NK. Observou-se que nenhum desses derivados de heparinas alterou a viabilidade nem a proliferação de células B16-F10. No entanto, os derivados de DNS e D2OS foram capazes de reduzir a invasão celular e o D2OS reduziu a migração celular. Os efeitos em camundongos C57BL/6 portadores de melanoma e tratados com as heparinas também foram avaliados. O tratamento com heparina ou D2OS (10 mg/kg) não afetou o crescimento sólido do tumor e apenas o tratamento com heparina foi capaz de reduzir o número de metástases pulmonares. A heparina e seus derivados não alteraram a proliferação, degranulação, produção de IFN- γ e a capacidade de células NK matarem células de melanoma. Esses resultados mostram que, além de não citotóxico, o derivado da heparina D2OS tem um efeito promissor contra as células de melanoma *in vitro*. Quanto aos efeitos *in vivo* eles poderiam ser investigados futuramente após administração de doses maiores do que a utilizada neste trabalho. Esses resultados também mostram que a heparina ou seus derivados não são capazes de alterar quaisquer parâmetros das células NK.

Palavras-chave: Câncer. Melanoma. Heparina. Derivados. Células NK.

ABSTRACT

Melanoma is one of the most aggressive and metastatic cancer types. It originates from melanocytes, the melanin-producing cells in the skin, which mutate and manipulate the microenvironment in favor of their development. Besides the discovery of new treatments, melanoma still highly refractory to many treatments, very difficult to treat in late stages and with several side effects, requiring the search for new compounds. Nowadays, new cancer treatments are focus in enhance the immune response against tumor cells, mainly T and Natural killer cells. NK cells are innate lymphocytes that are responsible for the elimination of infected or transformed cells. The activation or inhibition of NK cells will be determined by the balance between the ligands on the target cells to stimulatory or inhibitory receptors on NK cells surface. One of the most famous stimulatory receptor is the human NKp46 (Ncr1 mouse orthologue), that is present in almost all NK cells. Currently, there is an interest to find ligands for NKp46 to increase NK cells cytotoxicity. Heparin is a polysaccharide that was described as ligand for this receptor. Besides that, heparin is already used in clinics, is heparin due it anticoagulant activity. However, heparin administration have some side effects (bleeding and thrombocytopenia). Here, the potential activity of heparin derivatives: N-desulfated (DNS); 6-O-desulphated (D6OS); 2-O-Desulfated (D2OS), all of with less anticoagulant activity, to chance malignant parameters of murine melanoma cells B16-F10 and also the effect on NK cells activation was evaluated. It was observed that none of those heparins derivatives changes B16-F10 viability or proliferation. However, the DNS and D2OS heparin derivate were able to reduce the cell invasion and, D2OS reduced cell migration. The effects on melanoma-bearing C57BL/6 mice treated was also evaluated. Heparin or D2OS treatment (10 mg/kg) did not affect solid tumor growth and only heparin treatment was able to reduce lung metastasis. Heparin and its derivatives did not chance mouse NK cells proliferation, degranulation, IFN- γ production and killing capacity against tumor cells. Those results show that heparin or heparins derivatives are not capable to chance any parameters of mouse NK cells. This results show that besides non-cytotoxic, D2OS heparin derivate has a promisor effect of against melanoma cells *in vitro*, and it *in vivo* effects could be more investigate, increasing the doses for treatment. Those results also show that heparin or heparins derivatives are not capable to chance any parameters of mouse NK cells.

Keywords: Cancer. Melanoma. Heparin. Derivatives. NK cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 MELANOMA	7
2.1.1 Tratamentos para o Melanoma	10
2.2 POLISSACARÍDEOS E CÂNCER	11
2.3 HEPARINA	12
2.3.1 Heparina de baixo peso molecular	12
2.3.2 Heparina e Câncer	13
2.3.3 Heparina e Melanoma	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 GERAIS	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 HEPARINA	16
4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS HEPARINAS DESSULFATADAS	17
4.2.1 Preparo heparina na forma de sal de piridíneo	17
4.2.2 Remoção do N-sulfato ligado a glucosamina (DNS)	17
4.2.3 Remoção do sulfato 6-O ligado a glucosamina (D6OS)	17
4.2.4 Remoção de sulfato 2-O-ligado ao ácido urônico (D2OS)	18
4.2.5 Biotinilação da heparina e seus derivados	18
4.2.6 Ressonância magnética nuclear ¹³ C	19
4.2.7 Análise de homogeneidade	19
4.2.8 Quantificação Lipopolissacarídeos	19
4.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTICOAGULANTE DOS DERIVADOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS DA HEPARINA <i>IN VITRO</i>	20
4.4 CULTIVO CELULAR	21
4.4.1 Linhagens de Células de Melanoma	21
4.5 PREPARO DOS TRATAMENTOS E PROCEDIMENTOS PARA EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS ÀS HEPARINAS	21
4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO VERMELHO NEUTRO	21
4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR UTILIZANDO CRISTAL VIOLETA	22
4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS B16-F10	22

4.9 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR	23
4.10 MIGRAÇÃO CELULAR (<i>SCRATCH</i>).....	23
4.11 DETECÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	24
4.11.1 Marcações externas utilizando anticorpos.....	24
4.12 MARCAÇÃO UTILIZANDO LECTINA WGA.....	24
4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i>	25
4.13.1 Animais.....	25
4.13.2 Modelo tumor duplo <i>in vivo</i>	25
4.13.3 Tratamento <i>in vivo</i>	25
4.13.4 Identificação dos linfócitos presentes nos tumores subcutâneos	26
4.14 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS NK.....	27
4.14.1 Humanas	27
4.14.2 Murinas.....	27
4.15 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS NK.....	28
4.16 DOSAGEM DE INTERFERON- γ	28
4.17 ATIVAÇÃO E DEGRANULAÇÃO DE CÉLULAS NK.....	28
4.18 ENSAIOS DE CITOTOXIDADE CONTRA CÉLULAS TUMORAIS	29
4.18.1 Células NK e melanoma murino	29
4.18.2 Células NK e melanoma humano	30
4.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA HEPARINA COMERCIAL E DAS HEPARINAS DESSULFATADAS	31
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS HEPARINAS	34
5.3 HEPARINAS E SEUS DERIVADOS NÃO SÃO CITOTÓXICOS E NÃO AFETAM A PROLIFERAÇÃO NEM A MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16-F10	35
5.4 DERIVADOS DA HEPARINA SÃO CAPAZES DE ALTERAR PARÂMETROS DE MALIGNIDADE CELULAR	37
5.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR RELACIONADOS COM A INVASÃO.....	41
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA HEPARINA E SEU DERIVADO D2OS EM MODELOS MURINOS <i>IN VIVO</i>	42

5.7 EFEITOS DA HEPARINA E SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS EM CÉLULAS NK	44
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de 200 doenças e é caracterizado por um aumento descontrolado da proliferação celular, decorrente do acúmulo de mutações genéticas (INCA, [s.d.]). Para tanto, as células tumorais possuem vias de sinalização que as permitem evadir do processo de morte celular por apoptose, da senescência, bem como do sistema imune, além de induzirem a angiogênese e, principalmente, invadirem e colonizarem outros tecidos, processo este denominado de metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

No século XIX, Armand Trousseau estabeleceu uma relação entre câncer e trombose. Atualmente sabe-se que tromboembolismo associado ao câncer (TAC) é uma das principais patologias que levam os pacientes com câncer ao óbito. Os mecanismos que levam um paciente a desenvolver TAC ainda não estão bem esclarecidos, porém pacientes com câncer, em estágios mais avançados e que estão recebendo como tratamento quimioterápicos, apresentam uma maior chance de desenvolver TAC (ABDOL et al., 2018). Pacientes com melanoma, um dos tipos de câncer de pele, em estágios avançados que recebem tratamento com quimioterápicos e deixam de fazer o uso profilático de heparina também apresentam alto risco de desenvolver TAC (SPARSA et al., 2011).

Vale destacar que o melanoma, em estágios avançados, é muito difícil de tratar (DOMINGUES et al., 2018) e além disso, apresenta o maior número de mutações dentre todos os tipos de tumores humanos (ALEXANDROV et al., 2020). Com base no genótipo tumoral, o melanoma pode ser classificado em 4 tipos: mutante em BRAF, mutante em NRAS, mutante em NF1 e triplo negativo (cujos genes BRAF, NRAS e NF1 não são mutados) (AKBANI et al., 2015). Melanoma mutante em BRAF é o tipo mais comumente encontrado. Tal mutação leva a ativação constitutiva da via MAP quinase, levando à proliferação celular e evasão da apoptose (SHARMA et al., 2005). Muitas das terapias alvo para o melanoma tem como objetivo inibir a via ativada por BRAF, porém, existem poucas opções de tratamentos para os outros tipos de melanoma citados (DAVIS et al., 2018).

As terapias para o melanoma têm mudado ao longo do tempo, para alcançar melhores resultados. Neste contexto, a quimioterapia tem sido gradativamente substituída pela imunoterapia (KOZAR et al., 2019). Dentre as estratégias de imunoterapia que são indicadas para pacientes com melanoma, destaca-se a administração de citocinas pro-inflamatórias (IL-2 ou interferon- α) (MAVERAKIS et al.,

2015) ou de anticorpos monoclonais que bloqueiam *immune checkpoints* do tumor e estimulam linfócitos T citotóxicos (anti-CTLA-4L e anti-PD-1L) (DAVEY; WESTHUIZEN; BOWDEN, 2016; EGGERMONT; ROBERT, 2011; ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008). Esses *immune checkpoints* são moléculas endógenas que são expressos nos organismos para controlar o sistema imune e evitar que células saudáveis sejam eliminadas (MARIN-ACEVEDO et al., 2018). Porém, as células tumorais superexpressam essas moléculas (por exemplo PD-1 em melanoma), o que leva a uma inibição do sistema imune e conseqüentemente, expansão das células tumorais (KALBASI; RIBAS, 2020). Os imunoterápicos têm como função se ligar a essas moléculas inibitórias (por exemplo PD-1L), que não vão mais ficar disponíveis para interagir com receptores para PD-1 no linfócito T (DARVIN et al., 2018).

No contexto da imunoterapia, as células NK emergiram como alvos para a imunoterapia contra o câncer devido ao risco reduzido de doenças autoimunes. Além disso, como os linfócitos inatos estão preparados para matar células transformadas ou infectadas (VIVIER et al., 2011), eles não requerem seleção clonal prévia e expansão por antígenos específicos (SOUZA-FONSECA-GUIMARAES; CURSONS; HUNTINGTON, 2019).

Apesar dos novos tratamentos, a taxa de sobrevivência dos pacientes com melanoma continua baixa. Tais terapias apresentam muitos efeitos colaterais e são financeiramente inviáveis (KOZAR et al., 2019; WORKMAN et al., 2017). Um recente levantamento mostrou que 98% dos pacientes com melanoma tratados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) receberam um tratamento inadequado. Isso se deve à falta de padronização de diretrizes para o tratamento, onde a última diretriz para o tratamento para pacientes com melanoma foi atualizada em 2013 e sugere o uso do quimioterápico dacarbazina (considerada uma terapia ineficaz). Além disso, os novos tratamentos são financeiramente inviáveis, chegando a custar 25 vezes mais que o tratamento com dacarbazina (KALIKS et al., 2019). Com base no exposto, a busca por novos tratamentos é necessária. A heparina aparece como uma candidata promissora, porque, na clínica médica, muitos pacientes oncológicos já são tratados com este fármaco para evitar TAC. Além da ação anticoagulante, a heparina pode inibir metástases por bloquear a interação das células tumorais com plaquetas (via P-selectina) e prejudicar o desenvolvimento de tumores por inibir a ação de heparanases (BORSIG, 2010a). Porém, o uso crônico da heparina pode levar a sangramentos ou a um quadro clínico chamado de trombocitopenia (HWANG; LEE, 2016), que é uma

deficiência de plaquetas decorrente da produção, pelo organismo, de anticorpos contra o complexo formado por uma proteína liberada por plaquetas ativadas (PF4) e a heparina. Em casos mais brandos ocorre uma redução do número de plaquetas e em casos mais graves o organismo entra em um estado hipercoagulado podendo formar trombos (AREPALLY, 2017).

O uso de heparinas quimicamente modificadas, com reduzida atividade anticoagulante, pode ser uma maneira segura de utilizar esse fármaco (CASU; VLODAVSKY; SANDERSON, 2008; HWANG; LEE, 2016). A eficiência antitumoral de heparinas modificadas quimicamente já foi descrito em modelos *in vivo* de câncer pancreático (ALYAHYA et al., 2015) e melanoma (DUCKWORTH et al., 2015). Assim como a heparina, alguns derivados também são capazes de interagir com P-selectina e inibir a ação de heparanase, levando a uma redução de metástases (HOSTETTLER et al., 2007; STEVENSON; VARKI; BORSIG, 2007). Porém, existem poucos relatos dos efeitos diretos que a heparina ou seus derivados quimicamente modificados podem ter sobre células tumorais. Além disso, a heparina também poderia atuar estimulando as células NK, pois essas células apresentam 3 receptores estimulatórios que são ligantes de heparam sulfato e heparina (NKp30 e NKp44 expressos em humanos, e NKp46 expresso em humanos e camundongos) (HECHT et al., 2009; ZILKA et al., 2005).

Tendo em vista o exposto, nesse trabalho foram realizadas modificações químicas na heparina comercial a fim de remover seletivamente grupamentos sulfatos. A atividade anticoagulante destes derivados foi avaliada em comparação com a heparina não modificada, bem como a influência destas heparinas em parâmetros de malignidade (*in vitro* e *in vivo*) de células de melanoma murino B16-F10 e possíveis efeitos em células NK.

2 REVISÃO DE LITERATURA

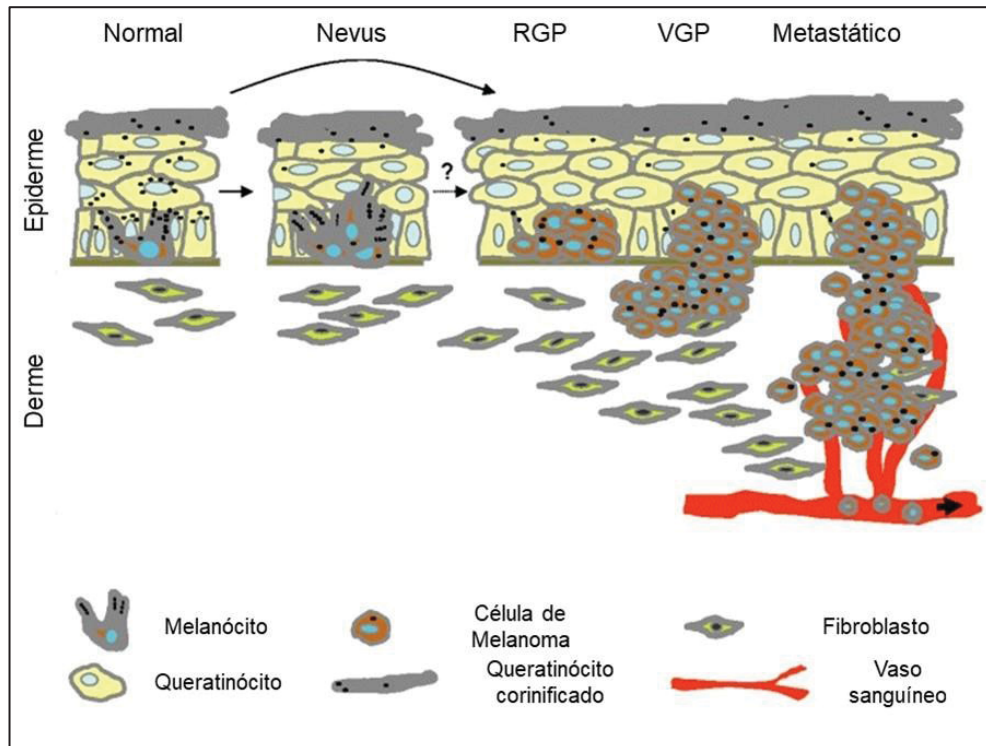
2.1 MELANOMA

Um levantamento mundial realizado pelo *Global Cancer Statistics* (GLOBOCAN), estimou para o ano de 2018 um total de 18,1 milhões de novos casos de câncer com 9,6 milhões de mortes. Desses, foram estimados 287 mil novos casos de câncer de pele do tipo melanoma com 60,1 mil mortes (BRAY et al., 2018).

No Brasil, foram estimados 420 mil novos casos de câncer (sem considerar 180 mil novos casos câncer de pele do tipo não melanoma) para cada ano do biênio

2018-2019. Para o câncer do tipo melanoma foram estimados 6260 novos casos (INCA, 2018). O melanoma, apesar de não ser o tipo de câncer mais comum, é caracterizado por ser altamente agressivo, metastático, refratário aos tratamentos existentes e por apresentar um prognóstico ruim (BATUS et al., 2014; GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). O melanoma se origina dos melanócitos, que são células derivadas da crista neural, localizadas principalmente na epiderme e tem como função produzir melanina. O melanoma ocorre de maneira esporádica e é causado por fatores ambientais, especialmente exposição à radiação UV, ativação de proto-oncogenes e alterações nos mecanismos de reparo do DNA. (GORANTLA; KIRKWOOD, 2014; PALUNCIC et al., 2016). Todo o processo molecular que leva ao melanoma ainda não está totalmente esclarecido, mas mutações em genes que promovem aumento da proliferação e sobrevivência são associados ao aparecimento do melanoma. Além das alterações genéticas, as células do melanoma induzem células vizinhas a produzirem fatores de crescimento e angiogênicos para favorecer o desenvolvimento do tumor (VILLANUEVA; HERLYN, 2008). Para se transformar em melanoma, os melanócitos passam por uma série de processos. O primeiro deles é o crescimento radial ou horizontal (fase RGF, *radial growth phase*), onde essas células sofrem alterações que aumentam a sua proliferação e sobrevivência (revisado por LIU et al., 2014). O próximo passo é o crescimento vertical (fase VGP, *vertical growth phase*), nesse processo as células do melanoma invadem a derme, podendo chegar ao endotélio e colonizar locais mais distantes (MILLER; MIHM, 2006). A Figura 1 ilustra esses processos de crescimento.

FIGURA 1 – FASES DE PROGRESSÃO DO MELANOMA



Os melanócitos alterados podem apresentar um crescimento desordenado, que pode ser radial (RGP) e/ou vertical (VGP). Quando essas células alcançam vasos sanguíneos ou linfáticos podem se espalhar pelo corpo e colonizar outros tecidos (metástase). Figura adaptada de Gaggioli e Sahai (2007).

Assim como outros tipos de tumores, o melanoma não é formado apenas por um conjunto de células tumorais, mas sim por uma associação com outros tipos celulares como fibroblastos, macrófagos, pericitos, células endoteliais, linfócitos B e T e *natural killer* (NK). Esse conjunto de células são importantes para as dinâmicas celulares envolvidas com a promoção ou inibição tumoral. Além de vários tipos celulares, a matriz extracelular (MEC) também é fundamental para a progressão tumoral (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012).

Dentre esses diversos tipos celulares do microambiente tumoral, destacam-se as células NK, que são linfócitos que participam da imunidade inata e são importantes para inibir o crescimento tumoral (HUNTINGTON; VOSSHENRICH; DI SANTO, 2007). A citotoxicidade das células NK pode ser controlada por muitos receptores estimulatórios (NKp30, NKp44, NKp46, CD16) e inibitórios (PD1, TIM3, TIGIT, KLRG1) na superfície celular (CHIOSSONE et al., 2018). Mesmo com a capacidade de matar células transformadas, as células cancerosas podem evitar sua vigilância imunológica (SOUZA-FONSECA-GUIMARAES; CURSONS; HUNTINGTON, 2019). Células tumorais são capazes de alterar moléculas da sua superfície e manipular o microambiente tumoral ao seu favor, para escapar da

vigilância imunológica, permitindo assim a possibilidade de uma maior disseminação metastática (KRASNOVA et al., 2017). Essas alterações incluem a superexpressão de ligantes para receptores inibitórios de células NK e diminuição na expressão de ligantes de morte (FAS, TRAIL) e ativadores de células NK e recrutamento de plaquetas (LÓPEZ-SOTO et al., 2017). Além disso, também ocorre a manipulação do microambiente tumoral levando a secreção de metaloproteases, que clivam a matriz extracelular (MEC) para gerar fragmentos que se ligam a receptores inibitórios de células NK, expressão de diferentes galectinas (1, 3 e 9) que levam a uma inibição das atividade citotóxica das células NK (ROSSI; TRINDADE; SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, 2020).

2.1.1 Tratamentos para o Melanoma

Em fases iniciais, o melanoma pode ser removido cirurgicamente. Porém, em estágios avançados, onde são observadas metástases, a remoção cirúrgica não é viável, necessitando o uso de outras estratégias como a administração de quimioterápicos (dacarbazina e temozolomida), imunoterápicos (uso de anticorpos como ipilimumab, pembrolizumab e nivolumab, bem como o uso de citocinas, como IL-2 e Inteferon- α) e terapias direcionadas (vemurafenib) (KOZAR et al., 2019).

Com relação aos tratamentos imunoterápicos, são administrados com o objetivo de estimular o sistema imunológico a eliminar o tumor. Existem de dois tipos, a saber:

1) Citocinas pró-inflamatórias IL-2 e interferon- α (IFN- α) (MAVERAKIS et al., 2015);

2) Anticorpos monoclonais que bloqueiam ligantes da membrana das células tumorais, os quais deixam de inibir a ação dos linfócitos T (anti-CTLA-4L e anti-PD-1L) (DAVEY; WESTHUIZEN; BOWDEN, 2016; EGGERMONT; ROBERT, 2011; ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008).

Já as terapias direcionadas tem como objetivo bloquear a via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) que estão constitutivamente ativadas em células do melanoma (AMARAL et al., 2017). Tais tratamentos apresentaram uma rápida regressão do melanoma, levando a um aumento considerável da sobrevivência dos pacientes, porém podem causar muitos efeitos adversos, além de que as células tumorais desenvolvem resistência ao tratamento (MENZIES; LONG, 2014; WELSH et al., 2016). Esse desenvolvimento de resistência

pode estar relacionado com a um aumento da expressão de mais receptores acoplados a tirosina quinase; aquisição de novas mutações que ativarão essas vias, mesmo na presença do inibidor e ativação de vias alternativas (LUEBKER; KOEPESELL, 2019).

Uma nova estratégia que vem sendo estudada é a combinação de terapia direcionada com imunoterapia. A ideia é tentar potencializar o efeito a longo prazo dos imunoterápicos e com a rápida ação das terapias alvo. Alguns testes clínicos já foram realizados e alguns cancelados devido aos efeitos adversos causados pelo tratamento combinado (YU et al., 2019). Por isso, a busca por novos tratamentos, que possam somar a estas terapias que são mais efetivas do que os quimioterápicos, ainda é necessária.

2.2 POLISSACARÍDEOS E CÂNCER

Uma família de moléculas com ação antitumoral são os polissacarídeos. Polissacarídeos podem ser extraídos de diversas fontes (plantas, algas, fungos e animais) e já demonstraram efeitos promissores contra muitos tipos de cânceres (KHAN et al., 2019). Nosso grupo de pesquisa vem avaliando o efeito de diversos polissacarídeos extraídos de diversas fontes (fungos, algas e animais), alguns com resultados muito promissores, como uma manogalactana parcialmente metilada extraída do fungo *Pleurotus eryngii*, que foi capaz de reduzir a invasão de células B16-F10 *in vitro* e reduziu o crescimento de tumores subcutâneos em camundongos (BISCAIA et al., 2017). Também foram testados polissacarídeos extraídos de algas marrons e verdes. Um polissacarídeo rico em fucose extraído da alga *Spatoglossum schroederi* (chamado fucana A) e um polissacarídeo extraído da alga verde *Gayralia brasiliensis* também foram capazes de reduzir a invasão de células B16-F10 *in vitro* (BELLAN et al., 2020; SANTI, 2015). Além disso, um fato em comum de todos esses polissacarídeos é que todos eles modularam características malignas de células B16-F10, sem apresentar citotoxicidade.

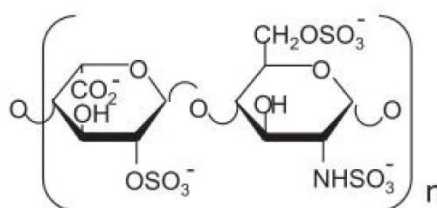
O potencial do uso terapêutico dos polissacarídeos para tratar diversos tipos de câncer é tão grande, que inclusive alguns estão em testes clínicos em pacientes com câncer de próstata (NCT00584532), carcinomas de células escamosas de pescoço e cabeça (NCT01720563) e contra tumores de mama, colorretal, pulmões e próstata (NCT00054977).

2.3 HEPARINA

A heparina é um polissacarídeo mundialmente conhecido e amplamente utilizado em clínica médica, devido a sua grande atividade anticoagulante (WARDROP; KEELING, 2008).

A heparina pertence à família dos glicosaminoglicanos, e apresenta uma massa molecular média de 10 a 15 kDa (MULLOY; GRAY; BARROWCLIFFE, 2000). A molécula de heparina é formada por unidades dissacarídicas repetitivas compostas por D-glucosamina ligada por ligação α -(1 \rightarrow 4) a um ácido urônico, em sua maioria ácido L-idurônico (em torno de 90%) e o restante (aproximadamente 10%) de ácido D-glucurônico. O ácido L-idurônico pode apresentar 2-O-sulfato ligado. No grupo amina da glucosamina encontra-se ligado um grupo acetil ou sulfato. A glucosamina apresenta ainda grupos sulfatos ligados ao oxigênio do carbono 6 e, raramente, do carbono 3 e 2. (GANDHI; MANCERA, 2008; MUÑOZ-GARCÍA et al., 2012; RUDD et al., 2010). O padrão de sulfatação da heparina varia de acordo com a fonte animal e método de purificação utilizado (CASU; NAGGI; TORRI, 2014). Segundo a *World Health Organization* (WHO) a heparina é um dos fármacos essenciais para a humanidade e faz parte de uma lista de drogas minimamente necessárias para um sistema de saúde básico (WHO, 2015). A Figura 2 representa a unidade básica da heparina.

FIGURA 2 - UNIDADE BÁSICA DA HEPARINA



A hexosamina da heparina é a D-glucosamina, e o monossacarídeo não nitrogenado é o ácido urônico. A figura acima ilustra a unidade básica da heparina, mostrando as possíveis variações nas unidades monossacarídicas. Observe que a glucosamina, pode ser N-sulfatada ou N-acetilada ou, ainda, 6-O-sulfatada, unida por ligação α -(1 \rightarrow 4) ao ácido α -L-idurônico 2-O-sulfatado. Fonte: adaptado de Casu; Naggi; Torri (2014).

2.3.1 Heparina de baixo peso molecular

A heparina de baixo peso molecular (LMHW) é obtida por cromatografia de permeação em gel ou após a fragmentação da heparina não fracionada por métodos químicos ou enzimáticos (LINHARDT; GUNAY, 1999; WEITZ, 1997). Um dos primeiros relatos de uso da LMWH foi feito em 1976 por Johnson e colaboradores,

que verificaram seu efeito anticoagulante, após ser aplicada subcutâneamente em voluntários saudáveis. Além disso, mostrou ter uma maior meia vida e capacidade de inibir o fator Xa, quando comparada com frações de heparina com fragmentos maiores (JOHNSON et al., 1976).

2.3.2 Heparina e Câncer

Pacientes com câncer podem apresentar a formação de trombos, um quadro clínico conhecido como Síndrome de Trousseau ou Tromboembolismo venoso (TAC) (FALANGA; MARCHETTI; VIGNOLI, 2013), que é caracterizada pela capacidade das células tumorais de ativar, indiretamente, a cascata de coagulação, levando a ativação/produção de fator Xa, fator VIIa, trombina e fibrina. Por sua vez, a ativação da cascata de coagulação pode auxiliar no crescimento tumoral, angiogênese, invasão e metástases (BORSIG, 2010a; FALANGA; PANOVA-NOEVA; RUSSO, 2009). Os mecanismos que as células tumorais utilizam para ativar a coagulação estão relacionados com:

- Produção de fator tecidual (TF), que por sua vez interage com fator VIIa e desencadeia a coagulação;
- Produção de citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β e fator de crescimento transformador-alpha (TGF- α) e fatores pró-angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF)) que estimulam células endoteliais a entrarem em um estado pró-trombótico (FALANGA; MARCHETTI; VIGNOLI, 2013; FALANGA; PANOVA-NOEVA; RUSSO, 2009).

Para evitar a formação dos trombos na corrente sanguínea, pacientes oncológicos são tratados com heparina não fracionada (UFH) ou LMWH. Foi observado que esses tratamentos levavam ao aumento do tempo de sobrevida. Um levantamento realizado por Tieken et al. (2016) mostrou que grande parte dos estudos que correlacionam esses achados são focados apenas na formação de trombos (TIEKEN; VERSTEEG, 2016). De fato, UFH ou LMWH podem inibir diversos componentes da cascata de coagulação, sugerindo uma ação antitumoral por meio deste mecanismo (NIERS et al., 2007; TIEKEN; VERSTEEG, 2016). Células tumorais se ligam a plaquetas via P-selectina, glicoproteína localizada na superfície das plaquetas, e a heparina pode competir com essa ligação (ligando-se a P-selectina),

inviabilizando essa interação, conseqüentemente, tornando essas células visíveis ao sistema imune (BOBEK; KOVAŘÍK, 2004; MULLOY et al., 2016).

Um levantamento realizado por Niers et al., (2007) mostrou que heparinas quimicamente modificadas, que perderam ou possuem uma ação anticoagulante menor, são capazes de reduzir o crescimento de tumores primários e reduzir metástases em ensaios *in vivo*, mostrando que a heparina pode ter outros efeitos sobre o tumor, além da sua ação anticoagulante (NIERS et al., 2007). De fato, alguns tipos de heparinas modificadas ainda mantêm interação como P-selectina, mas com alguns dados controversos. Wei et al., (2005) demonstrou que heparinas onde foram removidos os grupos sulfatos 2-O-ligados de unidades de ácido urônico e 3-O-ligados de unidades de glucosamina ainda mantiveram a capacidade de interagir com P-selectina e impediam a adesão de plaquetas em células tumorais (WEI et al., 2005). Entretanto, Hostettler et al. (2007) mostrou que após a remoção desses mesmos grupos sulfatos, a interação com P-selectina é drasticamente reduzida (HOSTETTLER et al., 2007). Vale ressaltar que nos dois trabalhos essa dessulfatação foi realizada como descrito em Jaseja et al. (1989).

Corroborando com esses dados, um polissacarídeo análogo a heparina isolado do molusco *Nodipecten nodosus*, com atividade anticoagulante menor que a da heparina, mas com atividade antitrombótica (GOMES et al., 2010), foi capaz de reduzir o número de metástases em camundongos inoculados com células de carcinoma de Lewis. Essa ação está relacionada com a sua capacidade de se ligar a P-selectina e impedir a ligação das células tumorais com plaquetas (GOMES et al., 2015).

Outro mecanismo de ação da heparina no câncer é a sua ligação a enzima heparanase. Câncer de bexiga (GOHJI et al., 2001), próstata (OGISHIMA et al., 2005), mama, cólon, fígado (VLODAVSKY et al., 1999) e melanomas (VORNICOVA et al., 2016) superexpressam heparanase. Essa enzima é uma endo β -D-glucuronidase que cliva regiões específicas de heparam sulfato em pequenos fragmentos (HÖÖK; WASTESON; OLDBERG, 1975; OGREN; LINDAHL, 1975). A heparina funciona como inibidor da heparanase por apresentar uma alta afinidade pelo sítio ativo e baixa degradação (LI, 2008). Heparinas onde o grupo 6-O-sulfato da glucosamina ou 2-O-sulfato do ácido urônico foram removidos continuam a inibir heparanase, porém, com a remoção do N-sulfato da glucosamina essa inibição é drasticamente reduzida (NAGGI et al., 2005)

O fato das heparinas quimicamente modificadas deixarem de apresentar ou terem seu efeito anticoagulante reduzido e, mesmo assim, continuarem atuando contra o câncer, traz uma grande vantagem no uso desses compostos na clínica médica, pois podem ser usadas doses maiores desses compostos como agentes antitumorais sem que o paciente tenha hemorragias, efeito adverso importante na utilização de heparina não modificada (CASU; VLODAVSKY; SANDERSON, 2008).

2.3.3 Heparina e Melanoma

Dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que quando células tumorais da linhagem B16-F10 (melanoma murino) foram expostas *in vitro* a UFH ou LMWH, parâmetros celulares importantes como proliferação e citotoxicidade não foram alterados (FERREIRA, 2012; SANTI, 2015). Interessantemente, LMWH foi capaz de diminuir processos de invasão e migração celular, além de levar à diminuição da expressão gênica de diversas moléculas que são importantes para a progressão do melanoma como: metaloproteases (MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9) e proteoglicanos (proteoglicano de condroitim sulfato-4, glipicam-3, perlecan, sindecam-1 e 2) (SANTI, 2015).

Existem também trabalhos na literatura mostrando a ação de heparinas quimicamente modificadas no melanoma. Duckworth e colaboradores (2015) observaram que heparina 2-O-dessulfatada-N-acetilada e 6-O-dessulfatada-N-acetilada não apresentavam atividade anticoagulante e não se ligavam à P-selectina. Em um experimento onde camundongos imunodeprimidos (Balb/c *nude*) foram pré-tratados com galectina-3 e inoculados com células de melanoma humano (ACA19+), o tratamento com essa heparina dessulfatada foi capaz de reduzir o número de metástases, quando comparado com o controle (galectina-3 e células). Esse trabalho mostrou nova possível atuação de heparinas modificadas, a inibição da galectina-3 (DUCKWORTH et al., 2015). A galectina-3 é uma lectina com sítio de ligação para β -galactósido (DONG et al., 2017). Ela é superexpressa em diversos cânceres: pancreático, bexiga, mama, colorretal (DONG et al., 2017) e melanoma (PRIETO et al., 2006). A galectina-3 está envolvida na progressão tumoral e angiogênese (FARHAD; ROLIG; REDMOND, 2018; NANGIA-MAKKER et al., 2000).

Em outro trabalho, Lapierre e colaboradores (1996) demonstraram que heparina 2,3-di-O-dessulfatada, sem atividade anticoagulante e com capacidade de inibição de heparanase, foi capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos

(C57BL/6) portadores de melanoma em modelos de metástase pulmonar (LAPIERRE et al., 1996).

Ainda não estão bem definidos quais os efeitos diretos em células tumorais devido ao tratamento com heparina, pois grande parte da literatura foca em interação com P-selectina e heparanases. Poucos trabalhos mostram efeitos diretos da heparina ou seus derivativos nas em células tumorais. Alguns trabalhos relataram que LMWH foi capaz de reduzir a invasão de células de melanoma humano da linhagem A375 *in vitro* (FEATHERBY et al., 2019) e reduzir a migração da linhagem M5 (CHALKIADAKI et al., 2011). Porém, ainda pouco se sabe sobre os efeitos diretos a exposição das células tumorais à heparina ou seus derivados.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Avaliar a ação antitumoral e antimetastática da heparina e de seus derivados seletivamente dessulfatados em modelo de melanoma murino (*in vitro e in vivo*) e sua ação em células *natural killer* (NK).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- a) Obter e caracterizar as heparinas seletivamente dessulfatadas;
- b) Avaliar a atividade anticoagulante (*in vitro*) das heparinas;
- c) Avaliar o efeito *in vitro* das heparinas (não fracionada e dessulfatadas) sobre o fenótipo metastático de células de melanoma da linhagem murina B16-F10;
- d) Investigar se as heparinas (não fracionada e dessulfatadas) são capazes de alterar o crescimento de tumor subcutâneo;
- e) Testar o efeito antimetastático das heparinas (não fracionada e dessulfatadas) utilizando o modelo de metástase pulmonar;
- f) Analisar se as heparinas (não fracionada e dessulfatadas) estimulam proliferação e atividade de células *natural killer* murinas e humanas

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 HEPARINA

Foi utilizada a heparina não fracionada, na forma sódica, obtida de mucosa suína (Biolberia, Barcelona, Espanha).

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS HEPARINAS DESSULFATADAS

Os grupamentos sulfatos das heparinas foram seletivamente removidos, como descrito por Yates et al., (1996).

4.2.1 Preparo heparina na forma de sal de piridíneo

Para os processos de dessulfatação em do *N*- ou 6-*O* sulfatos ligados a glucosamina, a heparina sódica foi convertida para a forma de sal de piridíneo. Heparina sódica (500 mg) foi solubilizada em 20 mL de água ultrapura e posteriormente aplicada em uma coluna contendo resina catiônica na forma H⁺ (DOWEX), onde os íons de sódio foram “trocados” por prótons. A coluna foi eluída com água ultrapura até a solução apresentar um pH maior (pH da água destilada), indicando que toda a heparina foi removida da coluna. A solução de heparina eluída da coluna teve o pH ajustado para 7,0 utilizando piridina, formando então a heparina na forma de sal de piridíneo, a qual foi congelada e liofilizada.

4.2.2 Remoção do N-sulfato ligado a glucosamina (DNS)

Heparina na forma de sal de piridíneo (200 mg) foi aquecida em 30 mL de solução de DMSO anidro puro contendo 10% de metanol (v/v) à 55 °C por 2 horas, sob agitação em uma placa aquecedora. Ao final da reação, foram adicionados 30 mL de uma solução de etanol (99,5%) saturado com acetato de sódio por 24 horas à -20 °C, para a precipitação dos polissacarídeos. Em seguida, o conteúdo da reação foi centrifugado (5000 x rpm, 10 minutos, 4° C), o sobrenadante descartado e o precipitado solubilizado em água ultrapura. Posteriormente dialisado em membranas com poros de 6 a 8 kDa (888-11353, Spectrum), contra água ultrapura por 24 horas e liofilizados.

4.2.3 Remoção do sulfato 6-O ligado a glucosamina (D6OS)

Heparina na forma de sal de piridíneo (200 mg) foi aquecida em 30 mL de solução de DMSO anidro puro contendo 10% de metanol (v/v) à 60 °C por 4 horas, sob agitação em uma placa aquecedora. Ao final da reação, foram adicionados 30 mL de uma solução de etanol (99,5%) saturado com acetato de sódio por 24 horas à -20 °C, para a precipitação dos polissacarídeos. Em seguida, o conteúdo da reação foi centrifugado (5000 rpm, 10 minutos, 4° C), o sobrenadante descartado e o precipitado

solubilizado em água ultrapura. Posteriormente dialisado em membranas com poros de 6 a 8 kDa, contra água ultrapura por 24 horas e liofilizados.

Como essa reação também remove o *N*-sulfato da glucosamina, foi necessário realizar uma *N*-ressulfatação. Para isso, o produto da reação anterior foi solubilizado em 15 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio (pH 9,0) e foram adicionados 200 mg de trióxido de enxofre de trimetilamina e aquecida à 55°C, em placa aquecedora e sob agitação, por 3 horas. Em seguida, mais 200 mg de trióxido de enxofre de trimetilamina foram adicionados à reação, que permaneceu sob aquecimento e agitação por mais 3 horas. Ao final da reação, foram adicionados 30 mL de uma solução de etanol (99,5%) saturado com acetato de sódio por 24 horas à -20 °C, para a precipitação dos polissacarídeos. Em seguida, o conteúdo da reação foi centrifugado (5000 rpm, 10 minutos, 4 °C), o sobrenadante descartado e o precipitado solubilizado em água ultrapura. Posteriormente dialisado em membranas com poros de 6 a 8 kDa, contra água ultrapura por 24 horas e liofilizados.

4.2.4 Remoção de sulfato 2-O-ligado ao ácido urônico (D2OS)

Heparina sódica foi dissolvida (200 mg) em 200 mL de NaOH 0,1 M, sendo sequencialmente congelada e liofilizada. Posteriormente, o pó obtido foi ressuspenso em água destilada e o pH ajustado com HCl (puro) para 7,0. Em seguida, a solução foi dialisada em membrana com poros de 6 a 8 kDa, contra água ultrapura por 24 horas e novamente liofilizada.

4.2.5 Biotinilação da heparina e seus derivados

Foi realizada uma reação química para adicionar uma molécula de biotina nos grupamentos carboxílicos da heparina ou seus derivados. A reação foi realizada com descrito por Trindade et al., (2008).

Brevemente, cerca de 1 mg de cada uma de heparina ou seus derivados dessulfatados (DNS, D6OS, D2OS) e 0,516 mg de EZ-Link biotina hidrazida (21340, ThermoFisher) foram dissolvidos em 5 mL de solução de HCl 0,1 M pH 4,8. A seguir, foi adicionado 0,383 mg de EDAC (Cloridrato de *N*- (3-dimetilaminopropil) -*N'*-etilcarbodiimida) (E7750, Sigma-Aldrich) e a reação foi monitorada em pHmetro, sendo mantido o pH 4,8 pela adição (gota a gota) de HCl 0,01 M por 5 minutos sob agitação constante. A reação foi interrompida pela adição de acetato de sódio 0,5 M

(concentração final), pH 4,8 e a solução foi agitada por 60 min. A solução foi então dialisada contra água destilada (*cut-off* 6-8 kDa), congelada e liofilizada.

4.2.6 Ressonância magnética nuclear ^{13}C

As heparinas foram diluídas (60 mg/mL) em água deuterada (D_2O) e analisadas em sondas para *probes* de 5 mm de diâmetro, a 37 °C. Os espectros de RNM- ^{13}C e ^1H foram calibrados utilizando o sinal do grupo acetil localizado em ~24.5 ppm. As análises foram realizadas no equipamento AVANCE III 600 MHz (Bruker Corporation) no Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

4.2.7 Análise de homogeneidade

A análise de homogeneidade das amostras foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo WATERS 2410, acoplado a um detector de índice de refração conectado em série com um detector de espalhamento de luz (modelo DAWN DSP, Wyatt Technologies Corporation, EUA). Foram utilizadas quatro colunas WATERS Ultrahydrogel dispostas de forma sequencial e apresentando diferentes limites de exclusão : 7×10^6 (coluna 2000); 4×10^5 (coluna 500); 8×10^4 (coluna 250) e 5×10^3 (coluna 120). O eluente, NaNO_2 0,1 M com NaN_3 a 0,02 % (m/v), foi administrado na coluna através de uma bomba peristáltica WATERS 515. As amostras foram solubilizadas em NaNO_2 0,1 M e ultrafiltradas em membranas de éster de celulose MILLIPORE, de porosidade 0,22 μm . Os resultados foram analisados utilizando o software ASTRA 4.70.07.

4.2.8 Quantificação Lipopolissacarídeos

A detecção e quantificação de LPS (lipopolissacarídeo) nas heparinas foi realizada como descrito por de Santana-Filho et al. (2012). Essa análise tem como objetivo identificar e fazer uma quantificação relativa dos ácidos graxos hidroxilados presentes no LPS. Para preparar a curva padrão, 1 mg de LPS foi solubilizado em 1 mL de água ultrapura, com auxílio de banho ultrassônico. Posteriormente o conteúdo foi dividido em 3 vials de vidro (300 μL da solução em cada vial) e liofilizados. A seguir, foram adicionados 400 μL de metanol e 100 μL de MeOH:HCl 3N em cada vial. Essa solução foi incubada por 20 horas a 80 °C, sendo posteriormente submetida a evaporação do solvente em temperatura ambiente. O próximo passo foi realizar uma acetilação nas amostras com a adição de 100 μL de anidrido acético + 100 μL de

piridina, deixando a 100 °C por 1 h. Os derivados acetilados foram então extraídos com 2 mL de hexano e, após evaporação do hexano, os derivados foram solubilizados em acetona e foram realizadas diluições a partir desta solução

Para o preparo das amostras, 10 mg das heparinas foram solubilizadas em 10 mL de água ultrapura. 500 µL de cada uma das soluções foram transferidos para vials de vidro e depois congelados e liofilizados. A seguir, foram adicionados 670 µL de metanol e 170 µL de MeOH:HCl 3N em cada vial. Essa solução foi incubada por 20 horas a 80 °C. O restante do processo foi realizado como descrito no processo de preparo da curva.

Após secagem das amostras derivatizadas, estas foram solubilizadas em 5 µL de acetona e 1 µL desta solução foi injetado no cromatógrafo gasoso da marca Varian 3800 acoplado a um espectrômetro de massas 4000 MS (*ion trap*) equipado com coluna capilar VF-1MS de 30 m × 0.25 mm (diâmetro interno). A rampa de temperatura utilizada foi: injetor 250 °C; forno inicialmente a 50 °C (2 minutos) aquecendo até 90 °C a uma taxa de 20 °C/min. Posteriormente foi feito um aquecimento até 280 °C numa taxa de 5 °C/min. Espectros de massas foram obtidos usando 70 eV a 200 °C. As análises foram realizadas usando o software *Saturn Workstation 5.1*

4.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTICOAGULANTE DOS DERIVADOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS DA HEPARINA *IN VITRO*

Para testar a capacidade anticoagulante das heparinas foi realizado o teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT). Os polissacarídeos, diluídos em soro fisiológico (0,9% NaCl), foram testados em diferentes concentrações, sendo a mais alta delas 1 mg/mL. O experimento foi realizado utilizando o kit APTT-SP (0020006300, HemosIL) e o equipamento Coag-A-Matte XM (Organon Teknina). Plasma de carneiro (50 µL) foi incubado com soro fisiológico ou amostras (50 µL), durante 1 minuto a 37 °C. Em seguida foi adicionado o APTT *reagent* (50 µL). Após 2,5 minutos foi adicionada uma solução de cloreto de cálcio e o tempo de coagulação foi mensurado no equipamento.

4.4 CULTIVO CELULAR

4.4.1 Linhagens de Células de Melanoma

Foram utilizadas células de linhagem de melanoma murino (B16-F10) e humano (A375). As duas linhagens foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (12800017, Gibco) contendo 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (25080094, Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (12657029, Gibco) não inativado, 1 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de estreptomicina (P3539, Sigma-Aldrich) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O subcultivo foi feito sempre ao atingir confluência máxima de 80% da área de crescimento, utilizando 0,05% de tripsina-EDTA (15400-054, Gibco) em PBS por 3 minutos a 37°C.

4.5 PREPARO DOS TRATAMENTOS E PROCEDIMENTOS PARA EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS ÀS HEPARINAS

Heparina ou seus derivados dessulfatados foram diluídos em DMEM sem SFB (5 mg/mL) e esterilizados utilizando filtros de seringa de 0,22 µm. As soluções de polissacarídeos estéreis foram alíquotadas em microtubos de 1,5 mL (500 µL) e armazenadas a -20°C. Para os experimentos que avaliaram a viabilidade e a proliferação celular, os tratamentos foram adicionados 24 horas após o plaqueamento das células, de modo a perfazer concentrações finais de 1; 10; 100 e 1000 µg/mL de cada uma das heparinas. Para os demais experimentos *in vitro* a concentração selecionada foi de 100 µg/mL. As células permaneceram durante 72 h na presença dos polissacarídeos e, em seguida, os parâmetros experimentais propostos foram avaliados.

4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO VERMELHO NEUTRO

Esse ensaio foi realizado como descrito originalmente por Borenfreund et al. (1985), e com modificações sugeridas por Repetto et al. (2008). Brevemente, células B16-F10 (400 células por poço) foram cultivadas em placa de 96 poços, tratadas com os polissacarídeos 24h após o plaqueamento e, após 72h de exposição aos tratamentos o meio foi removido. Cem microlitros de uma solução de vermelho neutro (N4638, Sigma-Aldrich) (40 µg/mL), diluída em DMEM sem SFB, foi adicionada às células, as quais foram mantidas na presença desta solução por 2h na incubadora. Em seguida, o corante retido no interior das vesículas ácidas celulares foi eluído com uma solução de etanol, ácido acético e água destilada (50%; 1%; 49% v/v), a placa

de cultura foi homogeneizada e a absorbância mensurada em espectrofotômetro de microplacas (Biotek Epoch) no comprimento de onda de 540 nm. Nos grupos controle foram adicionados a mesma quantidade de meio sem SFB que foi utilizada para tratar as células para manter as células nas mesmas condições. Também foram eluidos com a solução de poços que só continham células para serem usados como controle de cor do experimento (branco).

4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR UTILIZANDO CRISTAL VIOLETA

Após realizar a leitura das absorbâncias do experimento de viabilidade celular, as células B16-F10 foram lavadas cuidadosamente com água destilada e a seguir coradas com 100 µL de cristal violeta 0,25 mg/mL (178, VETEC) (diluído em água destilada), por 20 minutos à temperatura ambiente. O excesso do corante foi removido após duas lavagens com água destilada. O corante retido no interior celular foi então solubilizado com 100 µL uma solução de ácido acético 33% (v/v) em água destilada e a absorbância mensurada em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. Também foram eluidos com a solução de ácido acético poços que só continham células para serem usados como controle de cor do experimento (branco).

4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS B16-F10

Células B16-F10 foram plaqueadas (2300 células/poço) em lamínulas de vidro circulares em placas de 24 poços, e, após 24 horas, foram expostas, individualmente, a 100 µg/mL de cada uma das heparinas. Após 72 horas, as células foram lavadas com PBS a 37°C e fixadas com 2% de paraformaldeído (15714, Electron Microscopy Sciences (E.M.S)) em PBS por 30 minutos. A seguir, as células foram incubadas com ActinGreen (R37110, Thermo Scientific) diluído em PBS contendo 0,01 % de saponina (1 gota do reagente para 2 mL de solução) (para a marcação dos filamentos de actina) e 1 µg/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (D1306, Invitrogen), por 20 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando Fluoromount G (17984-25, E.M.S) e as imagens foram obtidas utilizando o sistema de microscopia de varredura a laser confocal A1R MP+ (Nikon) e analisadas utilizando o software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012).

4.9 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

Células B16-F10 foram previamente cultivadas em placas de 6 poços (12000 células/poço) e após 24 horas, tratadas, isoladamente, com 100 µg/mL de cada uma das heparinas por 72 horas. Ao final do tratamento as células foram soltas com uma solução de EDTA 2 mM e ressuspensas em DMEM sem SFB. Foram plaqueadas 80000 células previamente tratadas com as heparinas em DMEM sem SFB sobre insertos com poros de 8 µm (MCEP24H48, Merck Millipore) previamente cobertos com 35 µL de Matrigel (2,5 mg/mL), que ficam acomodados em placa de 24 poços. No fundo de cada poço foi adicionado DMEM com 20 % de SFB, para servir de quimioatratador para as células. Após 72 horas de experimento, as células foram lavadas e sequencialmente fixadas com 2 % de paraformaldeído em PBS por 30 minutos. A seguir, as células foram incubadas com de DAPI (1 µg/mL) e ActinGreen diluídos em PBS contendo 0,01 % de saponina por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a marcação, as células remanescentes na parte superior do inserto foram removidas com cotonetes, os insertos foram cortados com o auxílio de um bisturi e os foram colocados em laminas histológicas montadas com Fluormount G. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems), e analisadas utilizando o software Fiji. A análise consistiu de contar o número de células (utilizando a marcação dos núcleos) e dividir esse número de pela área do inserto.

4.10 MIGRAÇÃO CELULAR (*SCRATCH*)

Células B16-F10 foram plaqueadas em placa de 96 poços (1300 células por poço) e tratadas como descrito anteriormente. Após 72 horas, as células foram incubadas com 10 µg/mL Mitomicina C, diluída em DMEM sem SFB (concentração final no poço) (M0503, Sigma-Aldrich), por 2 horas, para evitar a proliferação celular. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS a 37°C e foi feito um risco no centro de cada poço utilizando o equipamento *wound maker* (4563, Essen BioScience). Os poços de cultura foram novamente lavados para remover as células soltas e foi adicionado DMEM com 10% de SFB. Para avaliar a migração celular, a placa foi colocada no equipamento IncuCyte Zoom (Essen BioScience), que fica dentro de uma incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Foram capturadas 3 imagens de cada poço (sempre no mesmo local) a cada 1 hora, durante o período de 24 horas.

4.11 DETECÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células B16-F10 foram previamente cultivadas em placas de 6 poços e tratadas como descrito anteriormente. Ao final do tratamento as células foram lavadas uma vez com PBS (37°C), soltas com uma solução de EDTA 2 mM (37°C) e ressuspensas em PBS e transferidas para tubos de citometria.

4.11.1 Marcações externas utilizando anticorpos

Para utilização de anticorpos que reconhecem epítomos externos, as células foram incubadas com PBS contendo 1 % de albumina de soro bovina (BSA) por 20 minutos a 4 °C, e então incubadas com anticorpos diluídos (1:100) na mesma solução, por 1 hora a 4 °C. As marcações foram realizadas separadamente utilizando os seguintes anticorpos: sindecam-1 (Santa Cruz, sc-7100), emmprin (CD147) (sc-9756, Santa Cruz) e CD44 (550838, BD). Após incubação com anticorpos, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 1800 RPM, as células lavadas em PBS a 4°C (2 vezes) e então fixadas com PFA 2% por 20 minutos (temperatura ambiente). As dispersões celulares foram então lavadas duas vezes com PBS (temperatura ambiente) para remover o excesso de fixador e então incubadas com PBS contendo 0,1 M de glicina (para bloqueio dos radicais aldeídos gerados pela fixação com PFA). Anticorpos secundários fluorescentes foram utilizados com o intuito de detectar, por citometria de fluxo, a presença dos anticorpos primários presentes na superfície celular. Os anticorpos secundários, diluídos em PBS, foram incubados por 40 minutos previamente à análise. Para revelar o anti-CD44 foi utilizado um anti-IgG de rato conjugado com FITC, diluído 1:100 (112095003, Jackson ImmunoResearch), e para o anti-emmprin e anti-sindecam-1 foi utilizado anti-IgG de cabra conjugado com Alexa Fluor 488 (A11078, ThermoScientific), diluído 1:300. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS e ressuspensas em 300 µL para posterior leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson (BD)). Os fluoróforos foram excitados com laser 488 nm e os sinais coletados no canal FL-1. Foram adquiridos 10000 eventos, que posteriormente foram analisados utilizando o software *FlowJo* (BD).

4.12 MARCAÇÃO UTILIZANDO LECTINA WGA

Para a marcação de ácidos siálicos da superfície celular, as células B16-F10 foram incubadas a 4°C com lectina WGA conjugada com Alexa Fluor 488 (W11261,

ThermoScientific) diluída 1:300 em PBS, em seguida os dados foram adquiridos e analisados como descrito no item anterior.

4.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

4.13.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas ou camundongos C57BL/6 *knockout* para o gene *Ncr1* (NKp46) com idade entre 8 a 12 semanas. A utilização dos animais, injeções de células e os procedimentos para os tratamentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal do *The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research* (WEHI), Melbourne, Austrália e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), certificado número 1298.

4.13.2 Modelo tumor duplo *in vivo*

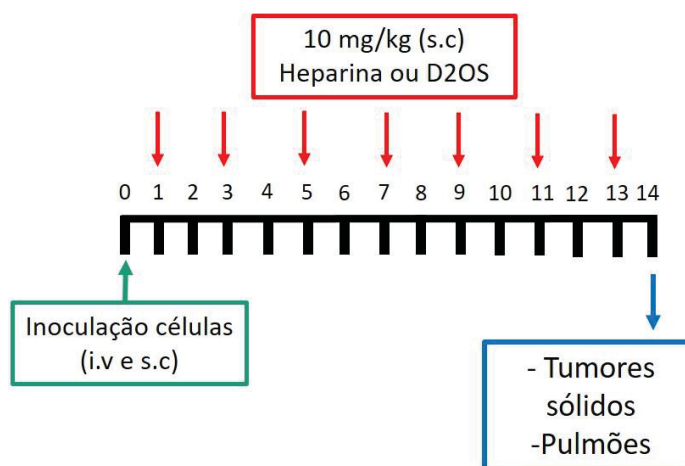
Foi utilizado um modelo onde no mesmo animal as células foram injetadas, no mesmo dia, pela via subcutânea e intravenosa, para o desenvolvimento de um tumor sólido e colonização pulmonar, respectivamente. Brevemente, 5×10^5 células B16-F10 (em PBS) foram injetadas tanto subcutaneamente no flanco direito de camundongos C57BL/6 como na veia caudal. Os tumores subcutâneos começaram a ficar visíveis a partir do 5º dia após a injeção e, a partir deste dia, foram medidos a cada dois dias utilizando um paquímetro digital e o volume foi calculado utilizando a fórmula $V = ab^2 \times \pi/6$ (a =diâmetro maior; b =diâmetro menor) (TOMAYKO; REYNOLDS, 1989). Após 14 dias, ao final do experimento, os animais foram anestesiados com Cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (20 mg/kg) diluídas em PBS, e tumores, pulmões, rins, fígados, baços e corações foram fixados com o fixador Fekete (700 mL etanol 100%, 32 mL formol 37%, 40 mL ácido acético, 228 mL dH₂O) por 24 horas e armazenados em etanol 70% (OVERWIJK; RESTIFO, 2001). Esse fixador deixa os tecidos mais claros, isso evidencia as metástases (pontos pretos nos pulmões) e facilita o processo de contagem, que é realizada a olho nu.

4.13.3 Tratamento *in vivo*

Heparina ou D2OS foram diluídas em PBS (2,5 mg/mL) e filtrados em membranas de 0,22 µm. Os animais foram tratados em dias alternados, com injeções subcutâneas de 100 µL por animal (10 mg/kg), 24 horas após a inoculação das células.

Como a heparina pode ser administrada via intravenosa ou subcutânea, foi escolhida a via subcutânea para evitar o estresse do animal, além disso para evitar inflamação local, foi escolhido fazer as aplicações a cada dois dias. O tratamento dos animais foi iniciado 24 horas após a inoculação das células e foram aplicadas 6 doses em cada animal (num total de 13 dias de tratamento e 14 dias de experimento, pois os animais foram eutanasiados um dia após o último tratamento). Para o cálculo da dose foi considerado que a massa média dos camundongos foi de 25 g. A figura 3 ilustra a linha do tempo dos experimentos.

FIGURA 3 – LINHA DO TEMPO DOS EXPERIMENTOS IN VIVO



Os experimentos *in vivo* foram realizados seguindo a linha do tempo ilustrada. As células B16-F10 foram injetadas no dia 0 pelas vias intravenosa e subcutânea (seta verde). Após 24 horas foram iniciados os tratamentos em dias alternados (s.c) (setas vermelhas). No dia 14, o experimento foi finalizado e os tumores e órgãos coletados (seta azul). **Fonte:** o Autor (2020)

4.13.4 Identificação dos linfócitos presentes nos tumores subcutâneos

Ao final dos experimentos *in vivo*, todos os tumores subcutâneos foram seccionados e incubados com 1 mg/mL colagenase tipo 4 (LS004186, Worthington Biochem) e 20 µg/mL DNase I (4716728001, Roche) em DMEM puro por 45 minutos a 37°C. A seguir as células foram centrifugadas (1800 rpm, 5 minutos, a 4 °C), lavadas uma vez com PBS e ressuspensas em 10 mL de PBS. A suspensão de células foi aplicada sobre 10 mL de Percoll (P4937, Sigma-Aldrich) (em um tubo de 50 mL), para separar as células tumorais das mononucleares por densidade. A seguir, as amostras foram centrifugadas (325 x g, temperatura ambiente, 20 min, sem freio). A camada superior de células foi coletada e marcadas com um coquetel de anticorpos para marcadores da superfície de leucócitos: anti-CD3 PE (100206, BioLegend) (marcador para linfócitos T), anti-CD8 PerCP (100732, BioLegend) marcador para linfócitos T

citotóxicos) e anti-NK1.1 FITC (553164, BD) (marcador para células NK) e 100000 eventos foram analisados por citometria de fluxo (FACSVerse, BD). Para análise foram utilizados o laser 488 nm para excitar os fluoróforos e foram capturados nos respectivos detectores: 527/32 (FITC), 586/42 (para PE) e 700/54 (PercP).

4.14 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS NK

4.14.1 Humanas

As células NK humanas foram isoladas do sangue de cordão umbilical cedido pelo *Royal's Children Hospital* (Melbourne, Austrália), autorizado pelo comitê de ética em pesquisa com humanos do WEHI. As células mononucleares foram separadas utilizando um gradiente de Ficoll (17144002, Sigma-Aldrich) e as células NK foram isoladas por seleção negativa utilizando um coquetel de beads magnéticas *EasySep™ Mouse NK Cell Isolation Kit* (19855, StemCell Technologies). As células NK foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio de cultura RPMI com 5% de soro humano AB (S2145, Sigma-Aldrich) e rIL-15 (50 ng/mL) e cultivadas em placas com fundo em “V”.

4.14.2 Murinas

Células NK foram isoladas de baços de camundongos C57/BL6, ou camundongos C57BL/6 *knockout* para o gene *Ncr1* (receptor NKp46) usando o kit de separação magnética (Miltanyi Biotec, Cat.130-115-818). Brevemente, os baços foram macerados em *streiners* com poros de 70 µm, ressuspensos em PBS e centrifugados a 400 x g por 10 minutos. A seguir, as células foram incubadas por 5 minutos com anticorpos biotinizados (contra todas as células do baço, menos células NK) (a 4 °C) para a seleção negativa de células NK, centrifugadas e *pallet* de células ressuspensado em PBS e incubado por 10 minutos com o anticorpo anti-biotina conjugado com *beads* magnéticas. A suspensão de células foi então aplicada em uma coluna acoplada a um ímã para a seleção das células NK, lavada duas vezes com PBS e as células que não ficaram retidas na coluna (células NK) foram coletadas. Após centrifugação (400 x g, 10 min), as células NK foram ressuspensas em meio de cultura RPMI com 10% de SFB e rIL-15 (50 ng/mL) e cultivadas em placas com fundo em “V”.

4.15 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS NK

Células NK isoladas conforme descrito no item anterior foram incubadas com 1 µg/mL de *CellTrace Violet* (CTV) (Thermo Fisher, Cat.C34557) por 30 minutos com e então 10000 células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com fundo em “v”, em meio RPMI-1640 com 10 % SFB, 0,1% β-mercaptoetanol, 50 ng/mL de rIL-15 e 100 µg/mL de heparina ou os seus derivados quimicamente modificados (DNS, D6OS e D2OS). A proliferação das células foi avaliada a cada 24 horas por 5 dias, por citometria de fluxo e os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo*. Para análise foi utilizado o laser 405 nm para excitar o CTV e o detector 440/40.

Nesse experimento a proliferação é baseada na diluição da marcação do CTV, todas as vezes que as células se dividem, a sua intensidade de fluorescência diminui (HAWKINS et al., 2007).

4.16 DOSAGEM DE INTERFERON-γ

A dosagem do IFN-γ foi realizada utilizando um kit de Elisa para detecção em células humanas e murinas (DIF50 e MIF00, R&D Systems). Brevemente, 10⁴ células NK foram expostas a heparina ou seus derivados dessulfatados (100 µg/mL), por 24 horas. Após a exposição, as placas foram centrifugadas (400 x g por 5 minutos), o sobrenadante de cada amostra foi armazenado em microtubos de 1,5 mL. Para realizar a dosagem, 50 µl do sobrenadante foram incubados por 2 horas em placas de 96 poços do kit previamente cobertas com anticorpo anti-IFN-γ. As placas foram lavadas com *washing buffer* e incubadas por 30 minutos com anti-IFN-γ conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) e revelado utilizando o reagente TMB (BD 555214). A absorbância foi medida utilizando a leitura no comprimento de onda 450 nm no equipamento Victor3 (PerkinElmer). Para obter os valores em pg/mL a absorbância foi comparada com uma curva padrão. Como controle positivo para expressão de IFN-γ, as células foram incubadas com IL-12 (10 pg/mL) e IL-18 (50 ng/mL), por 24 horas.

4.17 ATIVAÇÃO E DEGRANULAÇÃO DE CÉLULAS NK

Placas de 96 poços cobertas com sulfato de protamina, que é um ligante de heparina (HORROW, 1985), foram sensibilizadas com heparina biotinilada ou seus derivados dessulfatados biotinilados, como descrito por Melo et al., (2015).

Brevemente, os poços foram incubados com 200 μ L de sulfato de protamina (10 μ g/mL) em tampão Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,025 mM, BSA 1% e Tween 20 0,05% por 18 horas a 37°C. Os poços então foram lavados com PBS e, em seguida foram adicionados 100 μ L dos polissacarídeos biotinizados (100 μ g/mL em PBS) por 18 horas a 37 °C e novamente lavados com PBS. Para confirmar que os poços estavam sensibilizados com os polissacarídeos, alguns poços (sem células) foram incubados com estreptavidina conjugada com HRP, revelado utilizando o reagente TMB e a absorbância foi mensurada no equipamento Victor3.

Após a sensibilização da placa, foram plaqueadas 50000 células NK (isoladas do baço de camundongos) por poço, em meio RPMI-1640 com 10 %SFB, 0,1% β -mercaptoetanol, 50 ng/mL de IL-15, brefeldina A (Golgi stop) (1:100) (Sigma, Cat. B7651) e anti-CD107 conjugado com PerCP (1:100) (560646, BD Biosciences). Como controle positivo as células foram estimuladas com Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/mL) e Ionomicina (500 ng/mL) ou IL-12 (10 pg/mL) e IL-18 (50 ng/mL). Em seguida, a placa foi centrifugada a 400 x g por 5 minutos e cultivadas a 37 °C por 4 horas. Após a incubação as células foram fixadas e permeabilizadas usando o kit *Cytofix/Cytoperm* (554714, BD Biosciences) e incubadas com anticorpo anti-IFN- γ conjugado com FITC (1:100) (554411, BD Biosciences) por 30 minutos e foram adquiridos 10000 eventos por citometria de fluxo (FACSVerse). Para análise foi utilizado o laser 488 nm para excitar os fluoróforos e foram capturados nos respectivos detectores: 527/32 (FITC) e 700/54 (PercP).

Com esse ensaio a degranulação é avaliada pela quantidade de CD107 exposta na membrana das células NK, e o IFN- γ produzido fica acumulado no complexo de Golgi (devido a utilização da brefeldina).

4.18 ENSAIOS DE CITOTOXIDADE CONTRA CÉLULAS TUMORAIS

4.18.1 Células NK e melanoma murino

Células NK murinas foram, previamente, cultivadas por 24 h em meio de cultura contendo IL-15 (50 ng/mL), com ou sem heparina ou seus derivados (DNS, D6OS e D2OS) (100 μ g/mL). As células B16-F10 foram incubadas com 15 μ g/mL de Calceina AM (C1430, ThermoFisher) por 30 min a 37 °C. Esses dois tipos celulares foram utilizados para realizar o ensaio de co-cultura em diferentes proporções (50: 1, 25: 1, 12: 1, 6: 1 e 3: 1) em uma microplaca de fundo V de 96 poços, para avaliar a citotoxicidade das células NK contra células de melanoma. Após 4 h, a placa foi

centrifugada (300 g por 5 min), o sobrenadante foi coletado e transferido para placas opacas de 96 poços e a emissão de fluorescência (excitado com o comprimento de onda 488 nm e detectado com o filtro 530/15) foi medida com um leitor de microplacas EnVision (PerkinElmer). Quando ocorre a morte das células tumorais, o marcador Calceina fica disperso no sobrenadante e a quantidade de células mortas está relacionada com a intensidade de fluorescência no sobrenadante da cultura.

4.18.2 Células NK e melanoma humano

As células NK murinas, previamente, cultivadas por 24 h em meio contendo IL-15 (50 ng/mL), com ou sem heparina ou seus derivados (DNS, D6OS e D2OS) (100 µg/mL), foram incubadas com 5 µM de *Cell Trace Violet* (CTV). Em seguida, utilizadas para realizar o ensaio de co-cultura com células-alvo A375 (melanoma humano) na proporção de 4:1 em uma microplaca de fundo V de 96 poços. Após 4 h de co-cultura, as células foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio (PI) (BD Biosciences) de acordo com o fabricante, e as células foram avaliadas em um citômetro BD FACS Verse, a análise por citometria de fluxo foi realizada usando o software FlowJo. Para análise foram adquiridos 10000 eventos, utilizando o laser 488 nm para excitar os fluoróforos e foram capturados nos respectivos detectores: 527/32 (FITC) e 613/18 (PI).

4.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados que foram normalizados (em relação ao controle) foi aplicado o teste-T pareado e paramétrico. Já os que não foram normalizados, primeiro foi realizado um teste de normalidade, e, quando os dados não seguiam uma distribuição normal (Gaussiana), era aplicado o teste-T-Mann-Whitney (não paramétrico, não pareado) ou teste-T pareado (não paramétrico). Nos experimentos *in vivo* para avaliação de crescimento do tumor subcutâneo e *in vitro* para avaliar a migração celular foi aplicado o teste *two way* ANOVA com pós teste de Dunnett. Foram considerados significativos resultados com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA HEPARINA COMERCIAL E DAS HEPARINAS DESSULFATADAS

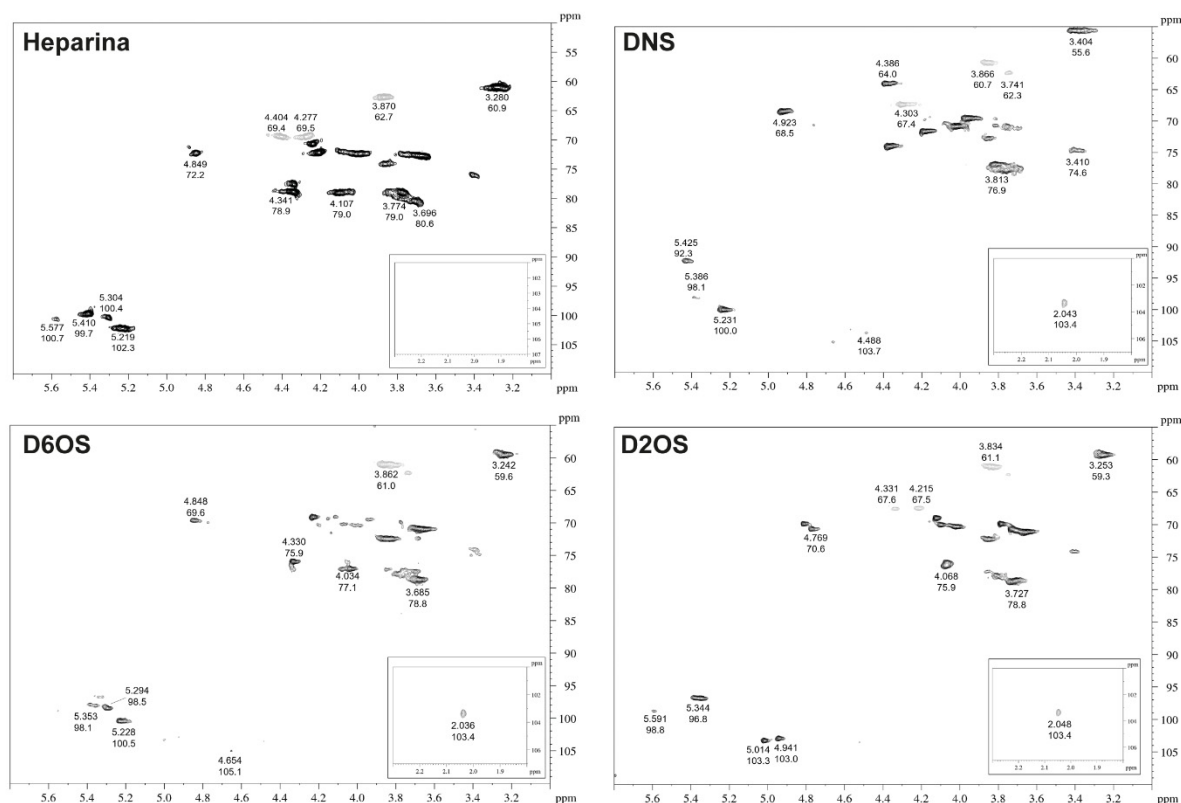
Antes de iniciar os experimentos biológicos foi necessário confirmar se as modificações químicas na heparina foram realizadas com sucesso e se os seus derivados foram, realmente, obtidos como esperado. Para tanto foram analisados os espectros de 2D-RMN heteronuclear ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) das heparinas dessulfatadas em comparação com o espectro da heparina comercial não fracionada. A Figura 4 mostra os resultados obtidos. Nota-se que nos espectros de RMN- ^{13}C da heparina e de seus derivados dessulfatados é possível identificar os seguintes sinais, como previamente descrito por Guerrini et al., (2001) e Yates et al., (1996):

- Heparina não modificada: H1/C1 das unidades 2-O-sulfatadas de ácido α -L-idurônico em δ 5.219/102.3; H1/C1 das unidades de α -D-glucosamina em δ 5.577/100.7, δ 5.410/99.7 e δ 5.304/100.4; H6/C6 das unidades de α -D-glucosamina 6-O-sulfatadas em δ 4.404/69.4 e δ 4.277/69.5 e H6/C6 não substituído em δ 3.870/62.7; H2/C2 das unidades de α -D-glucosamina N-sulfatadas em δ 3.280/60.9.
- Heparina N-dessulfatada (DNS): Após N-dessulfatação houve deslocamento dos sinais referentes ao H1/C1 e ao H2/C2 das unidades de α -D-glucosamina para δ 5.425/92.3 e δ 3.404/55.6, respectivamente, indicando que a modificação foi efetiva. O sinal de H1/C1 das unidades de ácido α -L-idurônico 2-O-sulfatado foi assinalado em δ 5.231/100.0 e o sinal discreto observado em δ 4.488/103.7 sugere a presença de ácido β -D-glucurônico na amostra. O sinal em δ 2.043/103.4 foi atribuído ao grupamento N-acetil ($\text{CH}_3\text{CO}-$) das unidades de glucosamina acetiladas.
- Heparina 6-O-dessulfatada (D6OS): A remoção do grupamento sulfato na posição 6 das unidades de glucosamina foi confirmada pela ausência de sinais referentes a C6 ligado (\sim 69.5) e intensificação do sinal em δ 3.862/61.0 referente a H6/C6 livre das unidades de glucosamina. A remoção do sulfato do C6 também promoveu o deslocamento do sinal de H1/C1 de tais unidades para δ 5.294/98.5 e δ 5.353/98.1. O sinal de H1/C1 das unidades de ácido α -L-idurônico 2-O-sulfatadas foi assinalado em δ 5.228/100.5 e o sinal discreto observado em δ 4.654/105.1 sugere a presença de ácido β -D-glucurônico. O sinal em δ 2.036/103.4 foi

atribuído ao grupamento N-acetil (CH₃CO-) das unidades de glucosamina acetiladas.

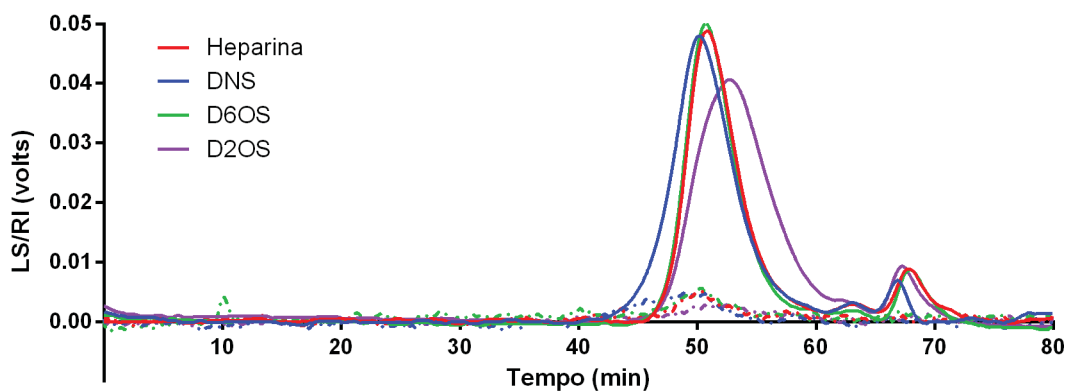
- Heparina 2-O-dessulfatada (D2OS): Com esta modificação química foi removido o grupamento sulfato da posição 2 das unidades de ácido α -L-idurônico. Tal modificação foi confirmada pelo deslocamento dos sinais de H1/C1 referentes ao ácido α -L-idurônico para δ 5.014/103.3 e δ 4.941/103.0. O sinal referente ao H2/C2 de tais unidades foi observado em δ 3.804/71.4, sendo o sinal em δ 4.340/78.9, referente ao H2/C2 das unidades 2-O-sulfatadas, ausente neste espectro. O sinal em δ 2.048/103.4 foi atribuído ao grupamento N-acetil (CH₃CO-) das unidades de glucosamina acetiladas.

Com o intuito de verificar a homogeneidade e integridade das heparinas após a dessulfatação, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detectores de espalhamento de luz em multiângulos e de índice de refração (HPSEC-MALLS-RI) (Figura 5). Tanto a heparina como seus derivados dessulfatados apresentaram perfil homogêneo quando analisados por ambos os detectores, com picos cromatográficos em tempos de retenção de ~50 a 55 minutos. Tal resultado sugere que os processos de dessulfatação não provocaram degradação e quebra inespecífica na estrutura da heparina. A heparina D2OS demorou mais tempo para eluir das colunas cromatográficas, o que sugere que, com o processo de 2-O-dessulfatação, maior teor de sulfato foi removido da estrutura da heparina, diminuindo de maneira mais significativa sua massa molar média, ou uma maior interação com as colunas.

FIGURA 4 – ESPECTROS DE RMN-¹³C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS

As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas conforme descrito em Material e Métodos. **Fonte:** o Autor (2020)

FIGURA 5 – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE



Heparina e seus derivados dessulfatados foram solubilizadas em NaNO₂ 0,1 M (1 mg/mL) e filtradas utilizando filtros com porosidade 0,22 µm. As amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo WATERS 2410, acoplado a um detector de índice de refração conectado em série com um detector de espalhamento de luz. Foram utilizadas quatro colunas WATERS Ultrahydrogel dispostas de forma sequencial e apresentando diferentes limites de exclusão: 7 x 10⁶ (coluna 2000); 4 x 10⁵ (coluna 500); 8 x 10⁴ (coluna 250) e 5

x 10³ (coluna 120). As linhas cheias referem-se ao detector de índice de refração e as linhas pontilhadas referem-se ao detector de espalhamento de luz. **Fonte:** o Autor (2020)

Como em alguns ensaios foram utilizadas células do sistema imunológico (células *natural killer*), as amostras de heparina foram também analisadas quanto à presença de lipopolissacarídeos (LPS), uma vez que são endotoxinas capazes de ativar essas células (KANEVSKIY et al., 2013). Para isso, foi utilizada a metodologia descrita por Santana-filho et al. (2012), que é diferente de outras metodologias já descritas, pois utiliza a detecção da porção lipídica do lipopolissacarídeo como forma de detectar LPS em preparações polissacarídicas, levando a menores incidências de detecções falso-positivas. Após injeção das amostras em GC-MS e análise dos cromatogramas, bem como dos espectros de massas que apresentavam os íons com *m/z* 103 e 257 (típicos dos fragmentos de massa gerados a partir dos ácidos graxos hidroxilados presentes na estrutura do LPS), não foi detectada a presença de LPS em nenhuma das preparações polissacarídicas avaliadas neste trabalho (dados não mostrados).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS HEPARINAS

Com o intuito de avaliar se as heparinas dessulfatadas apresentavam propriedades anticoagulantes alteradas foi realizado o ensaio *in vitro* para avaliar de aPTT. Foram consideradas anticoagulantes as heparinas que aumentaram o aPTT em pelo menos 1,5 vezes mais rapidamente do que o seu veículo (controle), neste caso, NaCl 0,9%. (Tabela 1). Heparina comercial não modificada apresentou atividade anticoagulante na concentração de 3 µg/mL. Após a remoção do sulfato em 6-O da glucosamina e em 2-O do ácido idurônico a atividade anticoagulante foi obtida em concentrações consideravelmente mais altas (10 e 60 µg/mL, respectivamente). A remoção do *N*-sulfato das unidades de glucosamina reduziu em mais de 150 vezes a capacidade anticoagulante da heparina, mostrando-se ativa apenas a partir de 500 µg/mL. Esses dados indicam uma redução na atividade anticoagulante das heparinas modificadas.

TABELA 1 - TEMPO TROMBOPLATINA PARCIALMENTE ATIVADA (aPTT)

Amostra	Tempo APTT (s)	Concentração (µg/mL)
NaCl (0.9 %)	25.5 ± 0.98	-
Heparina	58.4 ± 2,29	3
DNS	44.05 ± 1.48	500
D6OS	44.95 ± 1.45	10
D2OS	43 ± 1.43	60

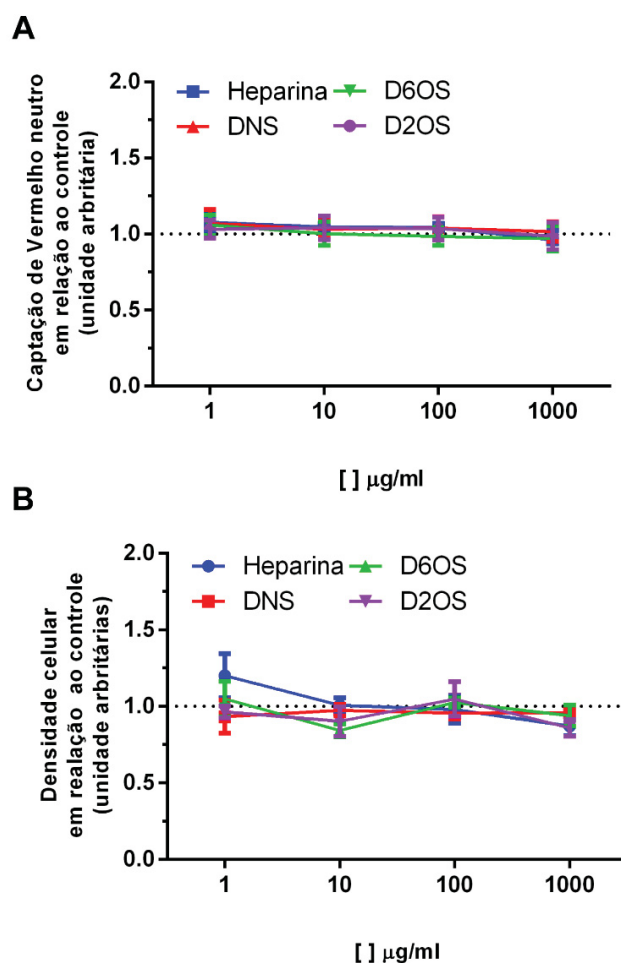
Heparina e as heparinas quimicamente modificadas foram inicialmente diluídas (1 mg/mL) em soro fisiológico (0,9% NaCl). O ensaio foi realizado utilizando o kit aPTT-SP no equipamento Coag-A-Matte XM (Organon Teknina). Para tanto, plasma de carneiro (50 µL) foi incubado com soro fisiológico ou amostras (50 µL), em diferentes concentrações e, então, foram incubadas por 1 minuto a 37 °C. Em seguida foi adicionado o APTT *reagent* (50 µL). Após 2,5 minutos foi adicionada uma solução de cloreto de cálcio e o tempo de coagulação foi mensurado. **Fonte:** o Autor (2020).

5.3 HEPARINAS E SEUS DERIVADOS NÃO SÃO CITOTÓXICOS E NÃO AFETAM A PROLIFERAÇÃO NEM A MORFOLOGIA DE CÉLULAS B16-F10

O primeiro teste nas células foi para avaliar os efeitos da heparina ou de seus derivados (DNS, D6OS e D2OS), sobre a viabilidade e a capacidade de proliferação da linhagem de melanoma murino B16-F10. Células que foram expostas a essas moléculas por 72 horas em diferentes concentrações (1; 10; 100 ou 1000 µg/mL) incorporaram o corante vermelho neutro, de forma similar àquelas células não tratadas, indicando que heparina ou seus derivados não são citotóxicos para as células B16-F10 (Figura 6A). Além disso, foi avaliado o efeito das heparinas sobre a proliferação das células de melanoma e, mesmo após 72 horas de exposição, nenhum efeito na proliferação foi detectado (Figura 6B). Foram avaliados os mesmos parâmetros (viabilidade e proliferação) após 24 e 48 horas (utilizando as mesmas concentrações) de exposição a heparina ou seus derivados, porém também não foi observada nenhuma alteração (dados não mostrados).

Como as células B16-F10 não apresentaram nenhuma alteração na viabilidade ou na proliferação celular após a exposição à heparina ou aos seus derivados foi selecionada a concentração de 100 µg/mL e o maior tempo testado (72 horas de exposição) para realizar os próximos ensaios. Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa também mostraram que heparina não modificada quimicamente e heparina de baixo peso (LMWH), na mesma concentração selecionada neste trabalho (100 µg/mL) e tempo de tratamento (72 horas), foram capazes de alterar alguns parâmetros importantes de malignidade celular, sem alterar a viabilidade das células da linhagem B16-F10 (SANTI, 2015).

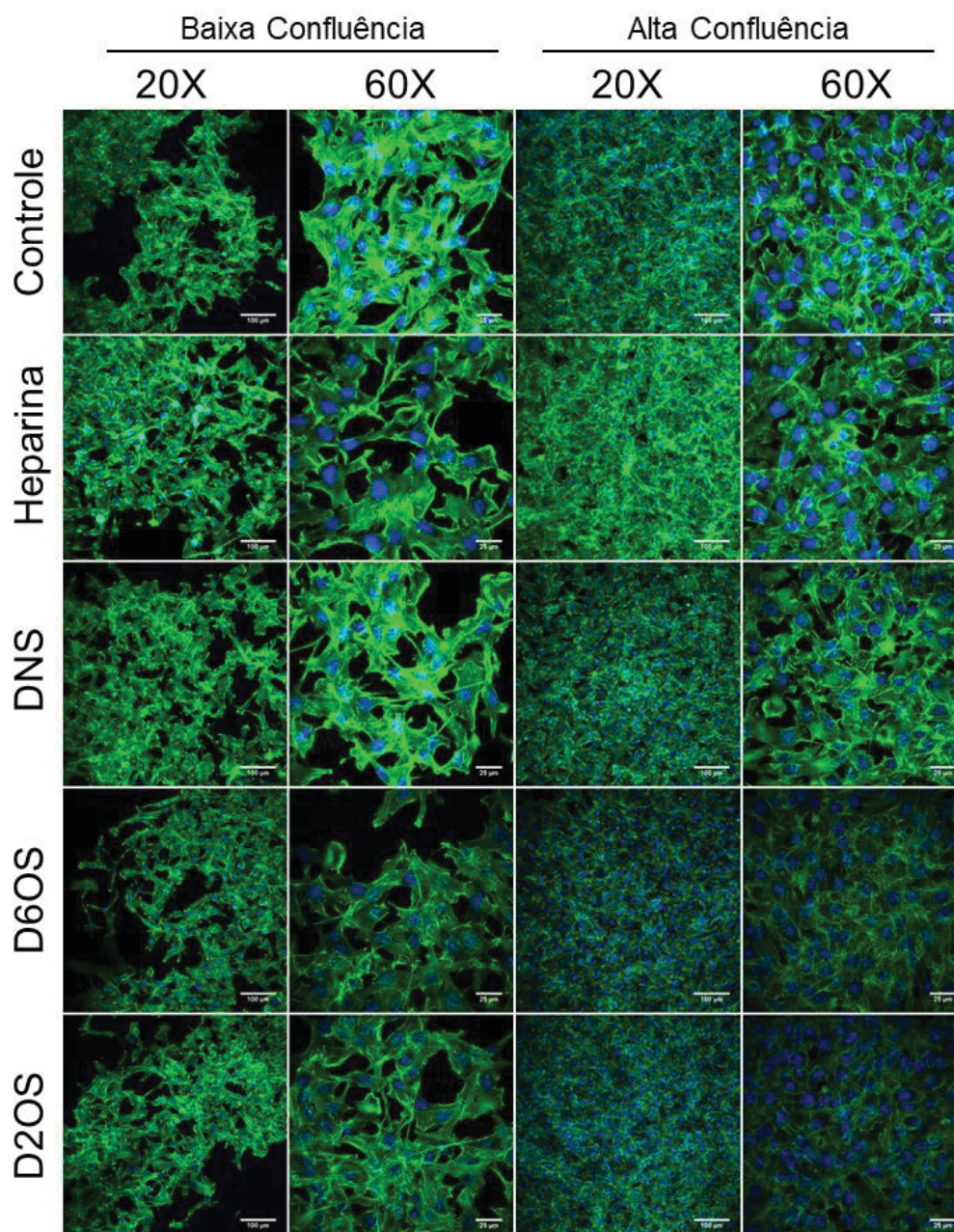
FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS



Células B16-F10 foram cultivadas em placas de 96 poços e foram expostas, ou não (controle) a diferentes concentrações de heparinas ou de seus derivados por 72 horas. **A:** Ao final do tempo de tratamento, as células foram incubadas com uma solução de vermelho neutro 40 µg/mL, por duas horas, para avaliação da viabilidade celular. Em seguida, o corante foi eluído com uma solução de etanol, ácido acético e água destilada (na proporção de 50%:1%:49%, respectivamente) e a absorbância foi mensurada em leitor de microplacas. **B:** Após a eluição do corante, as células foram lavadas e incubadas com uma solução 0,25 mg/mL de cristal violeta diluído em água, por 20 minutos para avaliar a densidade celular. Em seguida, o corante foi eluído com uma solução de 33% de ácido acético em água e a absorbância foi mensurada em leitor de microplacas. Cada ponto representa a média de 3 experimentos realizados em triplicata e as barras representam o desvio padrão. Teste estatístico realizado: Teste-T pareado paramétrico. **Fonte:** o Autor (2020).

O próximo passo foi avaliar se esses compostos causavam alguma alteração morfológica nas células B16-F10. Após 72 horas de tratamento os filamentos de actina das células foram marcados e observados em sistema de microscopia a laser confocal. Como pode ser observado na Figura 7, as células do grupo controle apresentam morfologia característica dessa linhagem celular, a saber: forma de fuso (alongadas com extremidades finas) e *epithelial-like*, além disso, a capacidade de crescimento sem inibição por contato também é observada (células crescendo umas sobre as outras). Quando expostas aos tratamentos, as células mantiveram essas características, não apresentando nenhuma alteração visível na morfologia.

FIGURA 7 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS A HEPARINA OU



Células B16-F10 foram cultivadas em laminulas circulares de vidro, em placas de 24 poços, e após 24 horas de exposição, as células foram expostas a 100 µg/mL de heparina não modificada, ou de uma das heparinas dessulfatadas testadas. O tratamento foi mantido por 72 horas e a seguir as células foram fixadas com 2% de paraformaldeído, diluído em PBS. Posteriormente, os filamentos de actina (verde) foram marcados com o reagente ActinGreen e o núcleo foram corados com DAPI (azul). As laminas foram montadas utilizando Fluoromont G e as imagens foram obtidas utilizando o sistema de microscopia de varredura a laser confocal A1R MP+ (Nikon), utilizando as objetivas de 20x (barra 100 µm) e de 60x (barra 25 µm). As imagens foram processadas utilizando o software Fiji. **Fonte:** o Autor (2020).

5.4 DERIVADOS DA HEPARINA SÃO CAPAZES DE ALTERAR PARÂMETROS DE MALIGNIDADE CELULAR

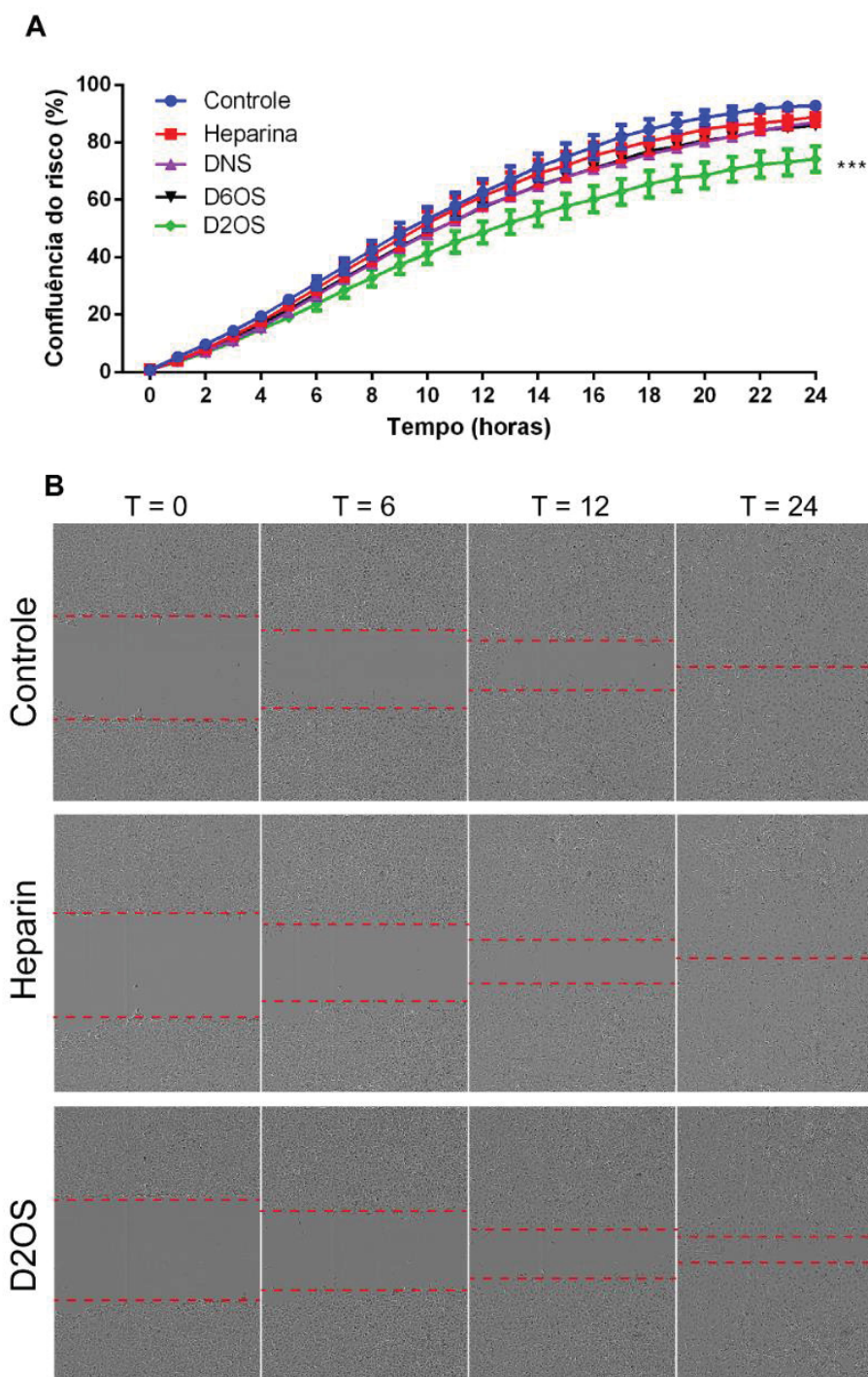
Após verificar que heparina e seus derivados não são citotóxicos e não alteram a proliferação, nem a morfologia das células B16-F10, o próximo passo foi

avaliar se após a exposição a esses polissacarídeos havia ou não alteração nos parâmetros importantes de malignidade celular, como as dinâmicas de migração e invasão celular.

Os resultados mostram que as células que foram expostas ao derivado D2OS apresentaram menor capacidade migratória, levando mais tempo para cobrir a área vazia do poço, quando comparada com o controle (Figura 8A e B). Em contrapartida, a heparina não modificada e os outros derivados dessulfatados (DNS e D6OS) não alteraram de maneira significativa a migração celular.

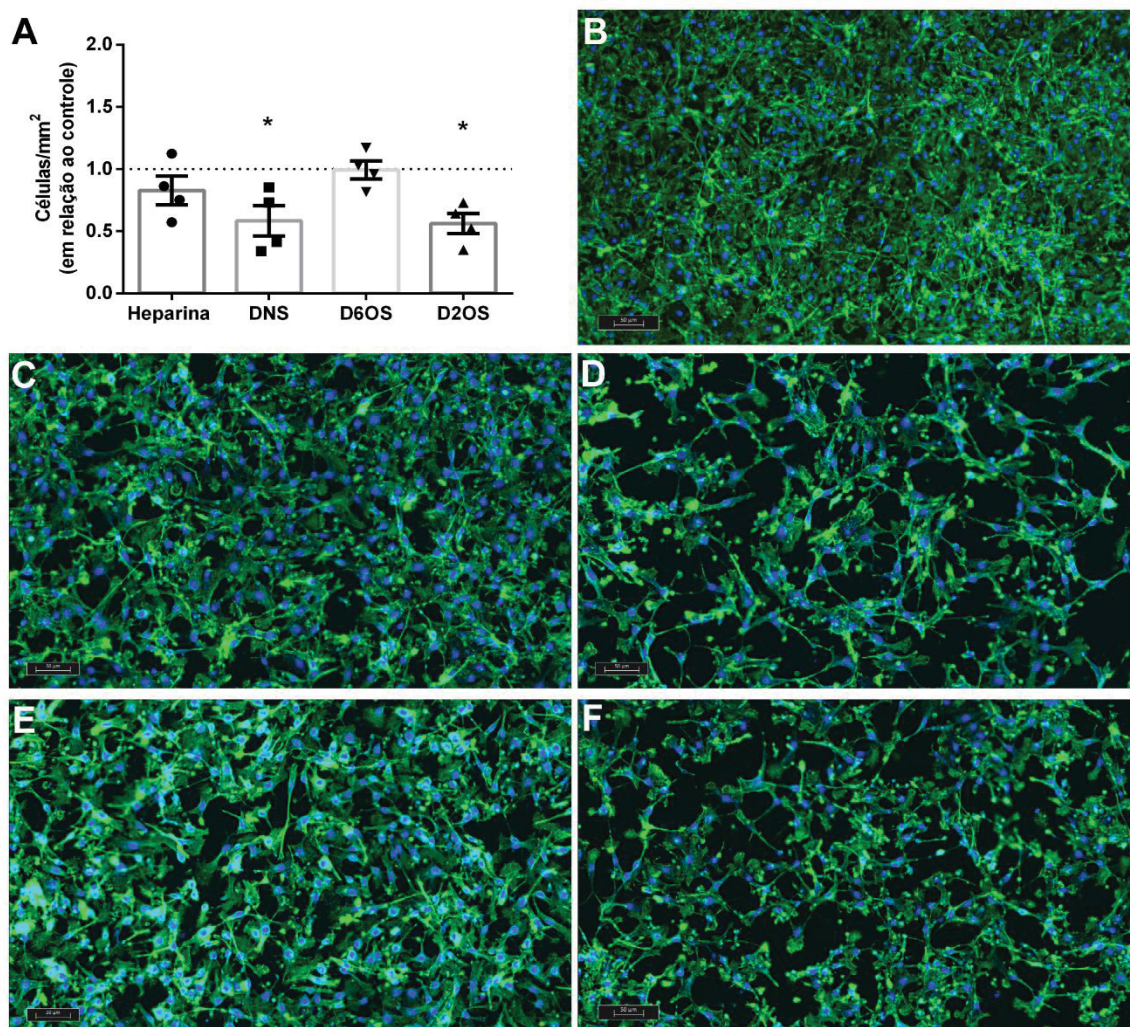
O próximo passo foi avaliar se após a exposição à heparina ou aos seus derivados, alteraria a capacidade invasiva das células B16-F10 (Figura 9A). As células que foram expostas a heparina comercial não modificada (Figura 9C) ou D6OS (Figura 9D) não apresentam nenhuma alteração significativa ($p \leq 0,05$) na capacidade invasiva. Porém, as células que foram expostas aos derivados DNS (Figura 9E) e D2OS (Figura 89) apresentaram uma redução de aproximadamente 40% na capacidade invasiva em relação às células controle.

FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE MIGRATÓRIA DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS À HEPARINA OU A SEUS DERIVADOS



Células B16-F10 foram cultivadas na presença de 100 µg/mL de heparina ou de seus derivados quimicamente modificados (DNS, D6OS, D2OS) por 72 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram expostas por 2 horas a Mitomicina C (10 µg/mL), e posteriormente foi feita a remoção das células em uma linha (como um risco) utilizando a ferramenta *Wound maker* e incubadas com meio de cultura livre de heparina ou de seus derivados, e então as placas contendo células foram mantidas no equipamento IncuCyte Zoom dentro da Incubadora de CO₂ (a 37° C). As imagens foram obtidas a cada 1 hora, durante 24 horas no equipamento IncuCyte Zoom. **A** – Gráfico representativo da média de triplicada, realizada em um experimento (3 experimentos independentes) indicando a confluência na área que foi realizado o risco; **B** – imagens representativas de cada poço com as células controle e tratadas com heparina ou D2OS. T= tempo em horas, *** p < 0,0001. **Fonte:** o Autor (2020).

FIGURA 9 – DERIVADOS DE HEPARINA DIMINUEM A CAPACIDADE INVASIVA DAS CÉLULAS B16-F10

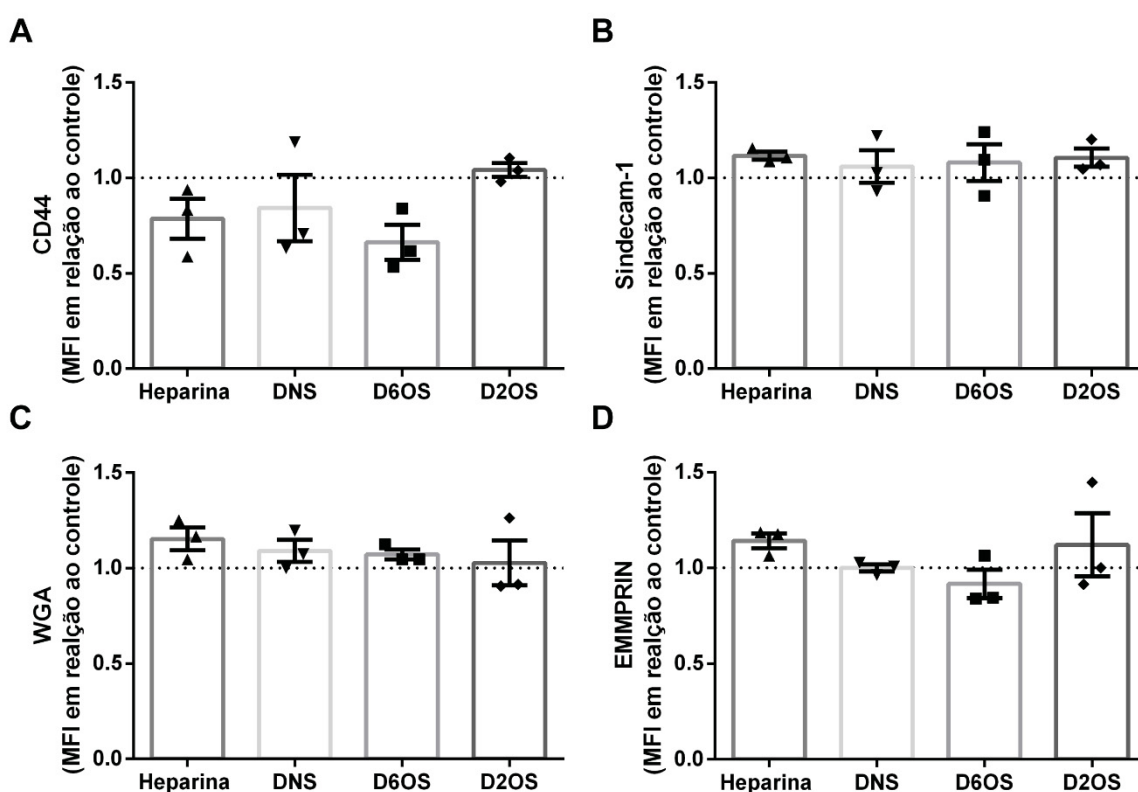


Células B16-F10 foram previamente cultivadas em placas de 6 poços e após 24 horas de exposição foram tratadas por 72 horas com 100 µg/mL de cada uma das heparinas. Ao final do tratamento, as células foram soltas com uma solução de EDTA e plaqueadas sobre insertos com poros de 8 µm previamente cobertos com Matrigel. No fundo de cada poço foi adicionado meio de cultura contendo 20 % de SFB, para servir de quimioatratante para as células. Após 72 horas de invasão, as células foram lavadas e sequencialmente fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS, e então foram expostas para DAPI (azul), com o propósito de corar os núcleos celulares e para *ActinGreen* para marcar os filamentos de actina (verde). A seguir, as células remanescentes na parte superior do inserto foram removidas com auxílio de um cotonete e os insertos foram colocados em lâminas histológicas, montadas com Fluoromount G. As imagens foram obtidas utilizando o Scanner de Lâminas Histológicas (microscópio Axio Imager Z2, Carl Zeiss em parceria com a Metasystems), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSslide (Metasystems), e analisadas utilizando o software Fiji. A análise consistiu de contar o número de células (se baseando pelos núcleos, que foram corados com DAPI) e dividir esse número pela área do inserto. **A**- Cada ponto representa a média de um experimento (realizado em duplicata), barras representam o erro padrão da média. **B a F**- Imagens representativas dos insertos; **B**- controle; **C**- heparina; **D**- DNS; **E**- D6OS; **F**- D2OS. * $p < 0,05$, Teste-T pareado paramétrico. **Fonte:** o Autor (2020)

5.5 AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR RELACIONADOS COM A INVASÃO

Para buscar explicar os resultados obtidos no ensaio de migração e de invasão celular, foram investigadas diversas moléculas que são presentes na superfície celular e são importantes para o processo tumoral e que poderiam ter sido alteradas após a exposição aos polissacarídeos. Foram avaliadas por citometria de fluxo a expressão das seguintes moléculas: CD44 (Figura 10A), sindecam-1 (Figura 10B), CD147 (basigina) (Figura 10C) e também foram avaliadas possíveis alterações no padrão de glicosilação da superfície celular, utilizando lectina WGA (Figura 10D). Após a exposição das células a heparina ou aos seus derivados, nenhuma alteração significativa foi detectada nesses marcadores.

FIGURA 10 – ANÁLISE DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR EM CELULAS B16-F10



Células B16-F10 foram cultivadas na presença de heparina ou de cada um dos seus derivados quimicamente modificados por 72 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram soltas com uma solução de 2 mM de EDTA, bloqueadas com 1 % de BSA e então marcadas com lectina WGA, ou com anticorpos anti-CD44, anti-CD147 ou anti-sindecam-1. As células foram fixadas e os anticorpos primários foram revelados com os seus respectivos secundários, conjugados com marcadores fluorescentes, como detalhado em Material e Métodos. Os resultados foram adquiridos por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média da duplicata de um experimento, comparado com a média da intensidade de fluorescência (MFI) do controle, e as barras representam o erro padrão da média. **A-** CD44; **B-** sindecam1; **C-** EMMPRIN (CD147); **D-** lectina WGA. Teste-T pareado paramétrico. **Fonte:** O Autor (2020).

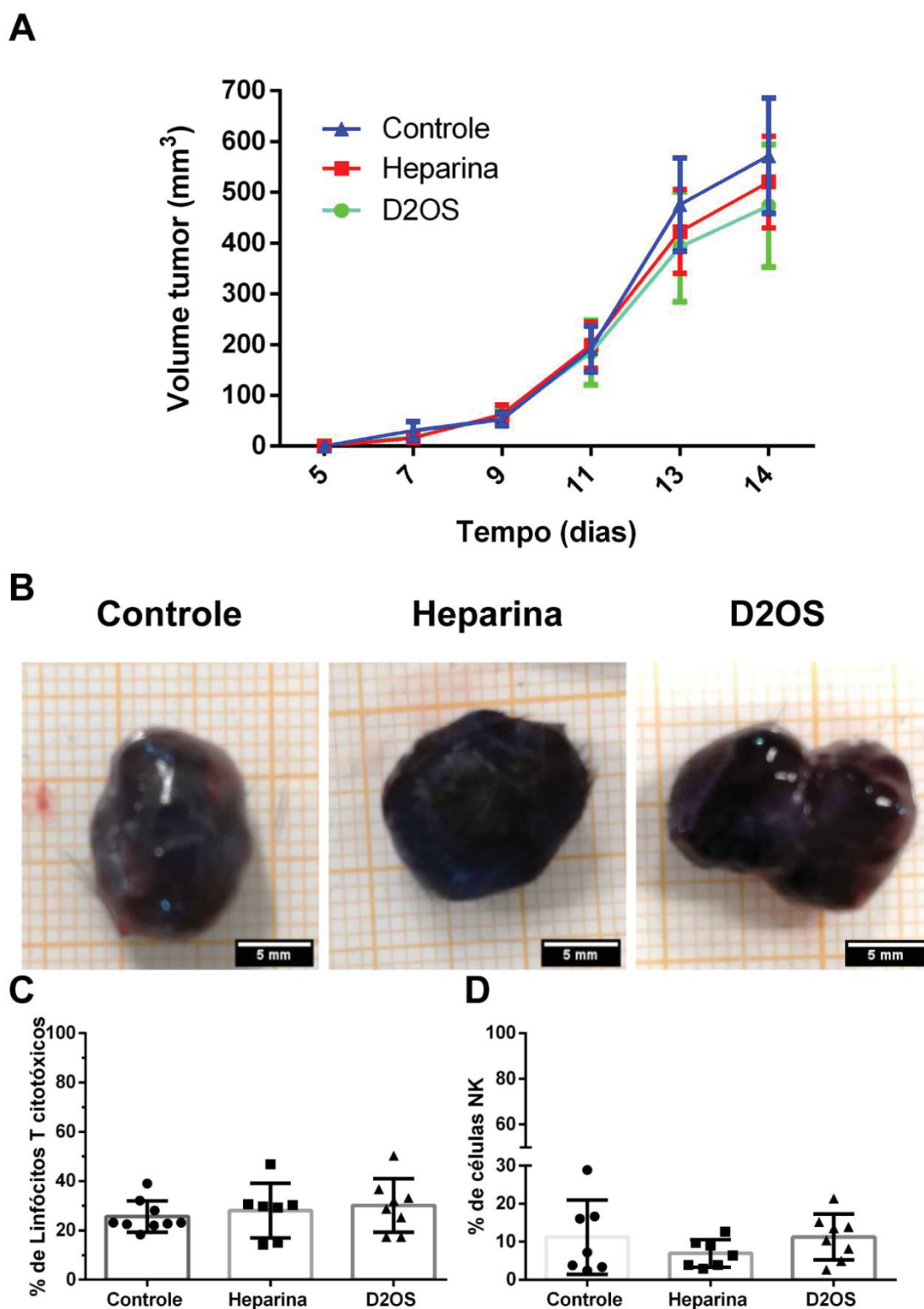
5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA HEPARINA E SEU DERIVADO D2OS EM MODELOS MURINOS *IN VIVO*

Como o derivado D2OS apresentou os melhores resultados *in vitro* (redução da migração e invasão celular) e ainda mantém atividade anticoagulante, essa molécula foi selecionada para seguir com os ensaios *in vivo*.

Foram utilizados dois modelos para avaliar a ação *in vivo* da heparina e de seu derivado D2OS no modelo de tumor sólido (inoculação subcutânea das células tumorais), bem como no modelo de colonização pulmonar (inoculação intravenosa).

No modelo de tumor subcutâneo foi avaliado o seu crescimento ao longo do tempo (dias). Nenhuma das heparinas testadas reduziu, significativamente, o volume final dos tumores, como demonstrado na Figura 11A. Ao final do experimento, também foi avaliada a infiltração de linfócitos T citotóxicos (CD3⁺ e CD8⁺) e células NK (CD3⁻ e NK1.1⁺) nos tumores sólidos, porém nenhuma alteração foi encontrada (Figura 11 C e D).

FIGURA 11 – EFEITO DA HEPARINA E DE SEU DERIVADO D2OS NO MODELO *IN VIVO* DE TUMOR SÓLIDO

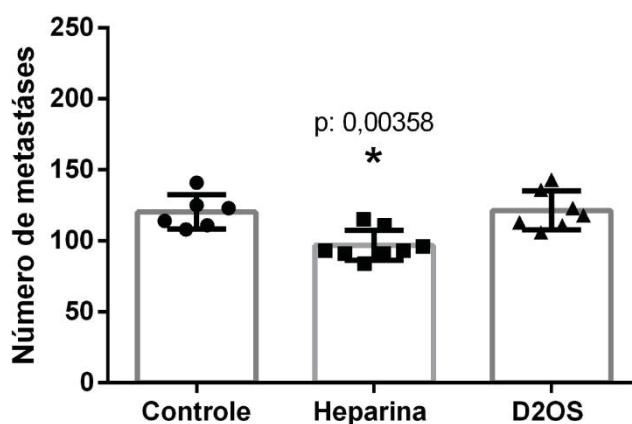


Células B16-F10 (5×10^5) foram injetadas pela via subcutânea no flanco direito e intravenosa na veia caudal de camundongos C57BL/6 e após 24 horas foi iniciado o tratamento, administrado pela via subcutânea, em dias alternados, com heparina ou D2OS (10 mg/kg). **A**- O volume dos tumores foi mesurado utilizando um paquímetro digital ao longo do experimento. **B**- Imagens dos tumores representativas de cada grupo. **C e D** – Análise por citometria de fluxo da infiltração do sistema imune no tumor subcutâneo. Cada ponto no gráfico representa um animal, as barras representam o erro padrão da média. * $p < 0,05$. **Fonte:** o Autor (2020).

Com relação ao número de focos metastáticos no pulmão, os animais que foram tratados com heparina apresentaram uma menor quantidade de focos metastáticos (Figura 12A). De forma Interessante, D2OS não reduziu o número de focos metastáticos, quando comparado com o controle.

FIGURA 12 – EFEITO DA HEPARINA E DE SEU DERIVADO D2OS NO MODELO *IN VIVO* DE METÁSTASE PULMONAR

A



B



Células B16-F10 (5×10^5) foram injetadas pela via subcutânea no flanco direito e intravenosa na veia caudal de camundongos C57BL/6 e após 24 horas foi iniciado o tratamento, administrado pela via subcutânea, em dias alternados, com heparina ou D2OS (10 mg/kg). **A-** Ao final do experimento os pulmões foram coletados, fixados com Fekete e as metástases foram contadas. **B-** Imagens dos pulmões representativas de cada grupo. Cada ponto no gráfico representa um animal, as barras representam o erro padrão da média. * $p < 0,05$. **Fonte:** o Autor (2020).

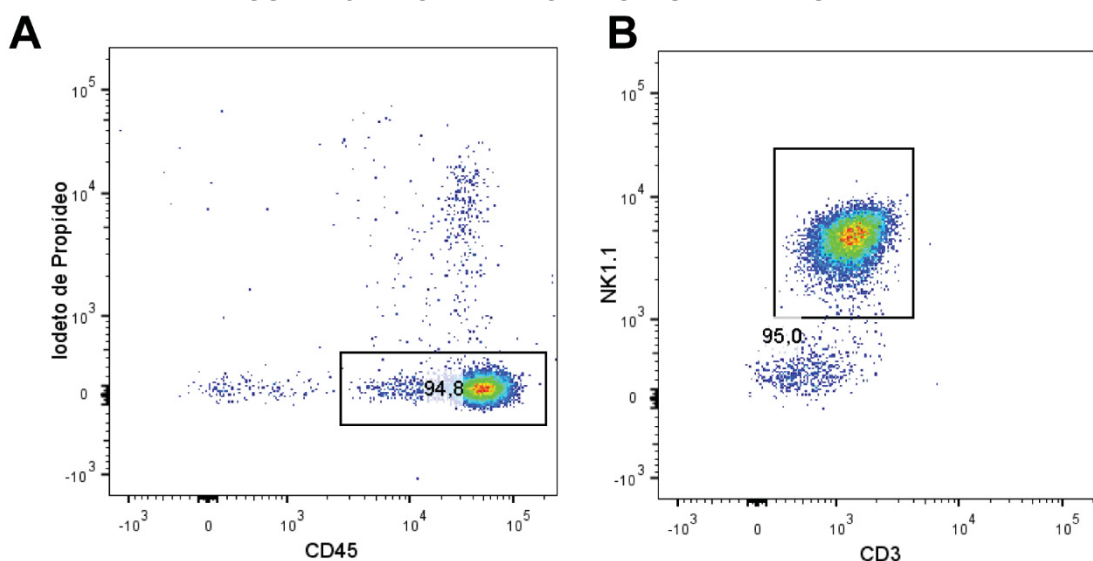
5.7 EFEITOS DA HEPARINA E SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE

MODIFICADOS EM CÉLULAS NK

Como as células NK são importantes para a eliminação de células metastáticas (KRASNOVA et al., 2017), foram investigados possíveis efeitos que a heparina ou seus derivados dessulfatados poderiam causar nessas células. Para tanto, foram utilizadas células NK murinas isoladas do baço de camundongos C57BL/6, utilizando a estratégia de separação negativa por *beads* magnéticas. Para

comprovar a pureza da purificação, as células foram marcadas com CD45 (presente em todos os leucócitos), CD3 (marcador de linfócitos T) e Nk1.1 (marcador de células NK). Como ilustrado na Figura 13, a pureza da purificação é de aproximadamente 95%. As células NK humanas foram isoladas do sangue de cordão umbilical, sendo sequencialmente isoladas por *beads* magnéticas, sendo que a pureza da suspensão celular foi confirmada por citometria de fluxo (dados não mostrados).

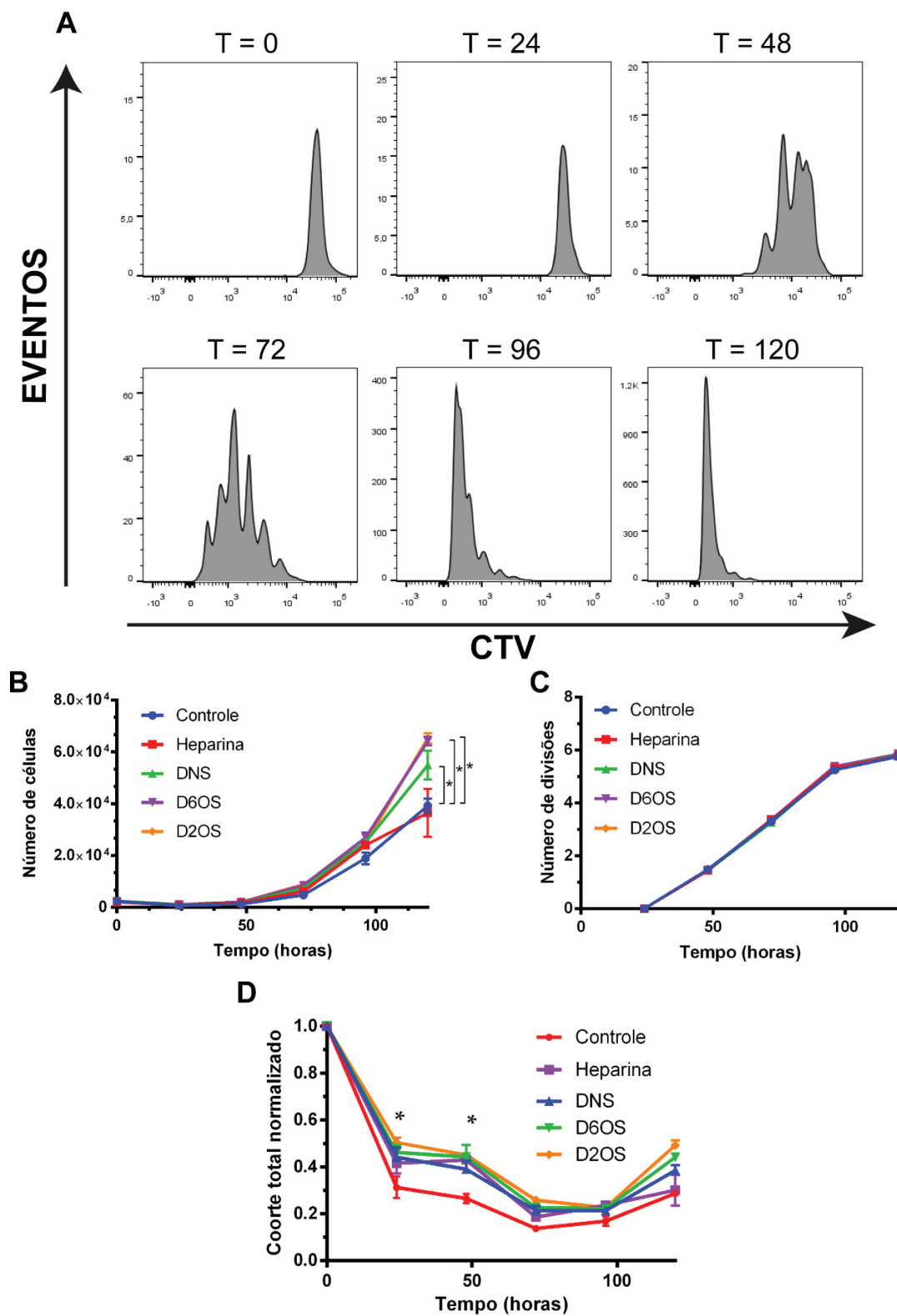
FIGURA 13 – ISOLAMENTO DE CÉLULAS NK MURINAS



Para confirmar que a suspensão celular continha apenas células NK isoladas a partir do baço de camundongos C57BL/6 utilizando *beads* magnéticas, foi utilizando a citometria de fluxo (representativo de uma extração). Foram consideradas células NK que apresentam marcação positiva tanto para a CD45⁺, quanto para o Iodoto de propídeo⁻, CD3⁻ e NK1.1⁺. **Fonte:** o Autor (2020).

O primeiro parâmetro avaliado foi o impacto que a heparina e seus derivados poderiam ter na proliferação *in vitro* das células NK. Nesse ensaio, as células incorporam em seu citoplasma o reagente *CellTrace*, e conforme as células se dividiam, a quantidade desse reagente era diluído pela metade (com consequente diminuição da intensidade da fluorescência) (Figura 14A). Todos os grupos que foram cultivados na presença das heparinas quimicamente modificadas apresentaram uma quantidade maior de células ao final do experimento (Figura 14B). Porém, não houve aumento no número de divisões celulares (Figura 14C). Nas primeiras 24 horas de experimento é possível observar na figura 14B que existe uma pequena diminuição na quantidade de células NK, e a proliferação só se inicia 48 horas após o início do experimento. Esse número maior de células foi decorrente do aumento da sobrevivência das células nos tempos iniciais do experimento (Figura 14D).

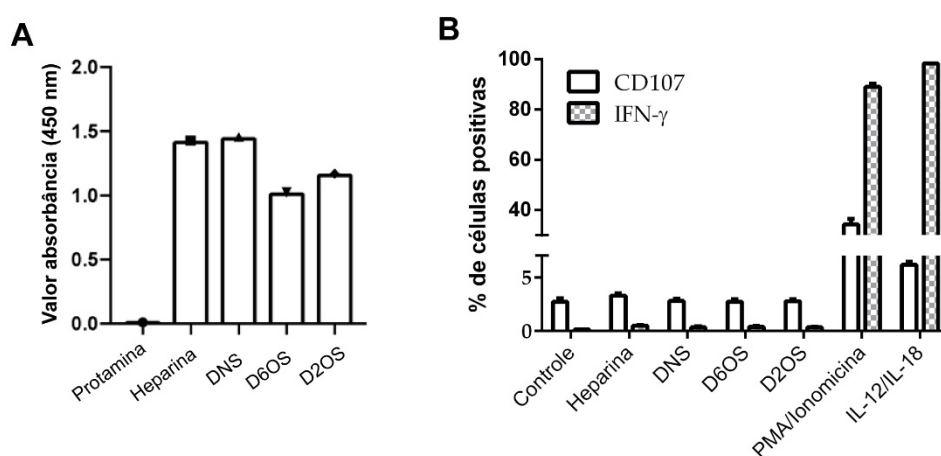
FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS NK NA PRESENÇA DE HEPARINA OU SEUS DERIVADOS



As células NK foram marcadas com *Cell trace Violet* (CTV) e plaqueadas em placas de 96 poços na presença de 50 $\mu\text{g/mL}$ de IL-15 e de 100 $\mu\text{g/mL}$ de heparina ou de cada um dos seus derivados (DNS, D6OS e D2OS) e avaliadas por citometria de fluxo. Gráficos representativos da média de triplicada, realizada em um experimento (3 experimentos independentes). **A**- Histogramas representando o padrão de marcação com o CTV ao longo do tempo; **B**- Número de células ao longo do experimento; **C**- número de divisões celulares; **D**- taxa de sobrevivência. * $p < 0,05$. Fonte: o Autor (2020).

Em seguida, foi avaliado se a heparina e os seus derivados quimicamente modificados levaram a uma ativação das células NK murinas. Para isso foram realizados dois ensaios. No primeiro ensaio, placas de 96 poços foram previamente conjugada com heparina ou seus derivados; esses compostos estavam biotinizados e a ligação na placa foi comprovada como demonstrado na Figura 15A. Células NK (isoladas do baço de camundongos) foram plaqueadas em uma solução contendo *Golgi stop* (para impedir a secreção de moléculas para o meio) e anticorpo anti-CD107 (para avaliar a degranulação dessas células) e cultivadas por 4 horas. Como consequência da ativação das células NK, os grânulos intracelulares (contendo granzima B e perforinas) se fundem a membrana plasmática, isso faz com que ocorra um aumento de CD107 na superfície das células NK (LORENZO-HERRERO et al., 2019). A figura 15B mostra que nenhum dos polissacarídeos testados foi capaz de estimular as células NK a produzirem IFN- γ ou a degranular.

FIGURA 15 – AVALIAÇÃO DA DEGRANULAÇÃO E PRODUÇÃO DE IFN- γ EM CÉLULAS NK MURINAS EM PLACAS CONTENDO HEPARINA OU SEUS DERIVADOS

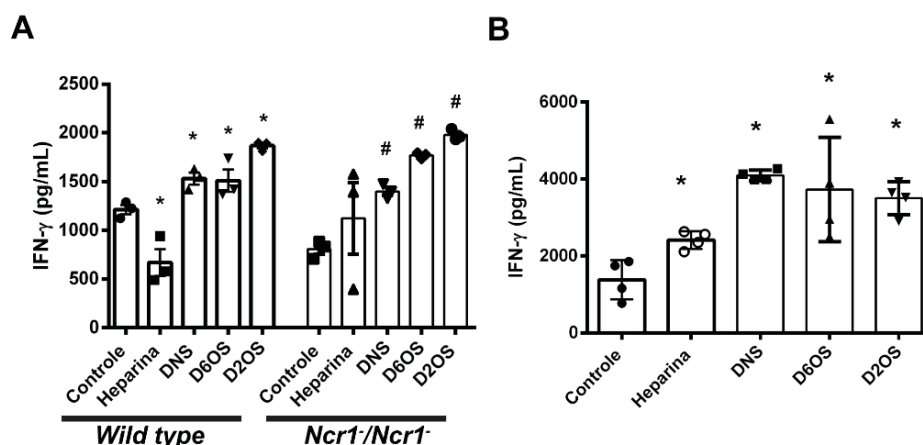


Células NK foram isoladas a partir do baço de camundongos C57BL/6 utilizando *beads* magnéticas. Placas de 96 poços foram sensibilizadas para ligação de heparina ou de seus derivados quimicamente modificados e biotinizados. **A**- Comprovação que a sensibilização da placa foi realizada com sucesso. **B**- Células NK foram cultivadas na presença 50 ng/mL de IL-15, brefeldin A (1:100) e anti-CD107 conjugado com APC (1:100) e 100 μ g/mL de heparina ou cada um dos seus derivados (DNS, D6OS e D2OS). Após 4 horas de cultivo, as células foram fixadas e permeabilizadas com o kit Cytotfix/Cytoperm e incubadas com anticorpo anti IFN- γ conjugado com FITC. Média de 3 experimentos, as barras representam o erro padrão da média. **Fonte:** o Autor (2020)

Em outro ensaio, as células NK (humanas e murinas) foram cultivadas na presença dos polissacarídeos por 24 horas e foi dosada a quantidade de IFN- γ no sobrenadante da cultura. Células NK (humanas e murinas) que foram expostas apenas a heparina ou a seus derivados quimicamente modificados (100 μ g/mL) não apresentaram nenhum nível detectável de IFN- γ (dados não mostrados). Entretanto,

quando células NK murinas foram cultivadas na presença de estimuladores da produção de IFN- γ (IL-12 e IL-18), a heparina diminuiu a produção dessa citocina (Figura 16A). Por outro lado, todos os derivados foram capazes de aumentar ainda mais a produção de IFN- γ . Também foi avaliada a produção de IFN- γ em células NK que não expressam o receptor NKp46, mas não houve alteração do resultado já observado para células que expressam constitutivamente o receptor, sugerindo que tal receptor não está envolvido nas respostas observadas. Em células NK humanas, heparina e todos os seus derivados foram capazes de potencializar os efeitos das citocinas IL-12 e IL-18 na produção de IFN- γ (Figura 16B).

FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- γ NA PRESENÇA DE HEPARINA OU DE SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS EM CÉLULAS NK MURINAS E HUMANAS

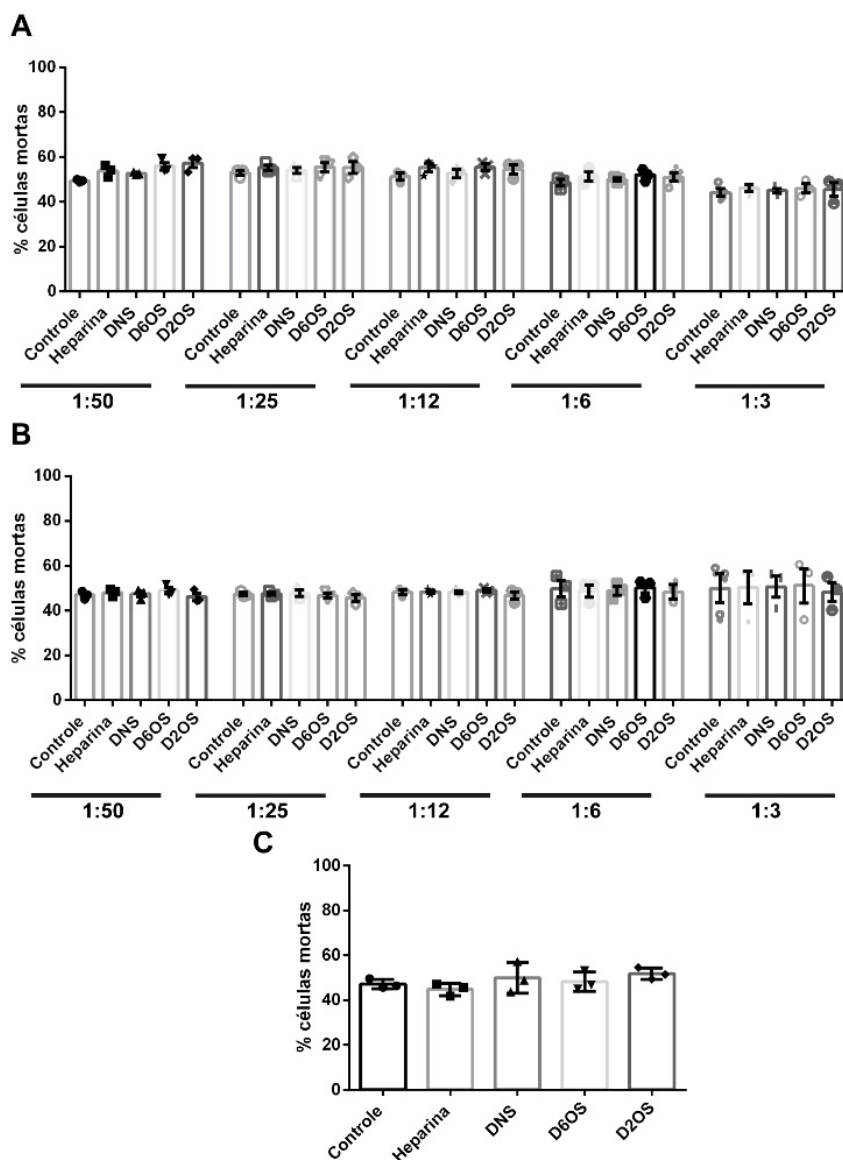


A- Células NK isoladas de camundongos *Wild type* ou *Ncr1/Ncr1*⁻ foram cultivadas na presença de IL-12 (10 pg/mL) e IL-18 (50 ng/mL) e de heparina ou cada um dos seus derivados (100 μ g/mL) por 24 horas, o sobrenadante foi coletado e foi realizada a dosagem de IFN- γ por ELISA. Cada ponto nos gráficos representa um experimento. * $p < 0,05$ comparado com o controle *Wild Type*, # $p < 0,05$ comparado com o controle *Ncr1/Ncr1*⁻. **B-** Células NK isoladas do sangue de cordão umbilical foram cultivadas na presença de IL-12 (10 pg/mL) e IL-18 (50 ng/mL) e de heparina ou cada um dos seus derivados (100 μ g/mL) por 24 horas, o sobrenadante foi coletado e foi realizada a dosagem de IFN- γ por ELISA. Gráfico representativo de um experimento (de um total de dois experimentos) * $p < 0,05$. **Fonte:** o Autor (2020).

Como as heparinas elicitam a produção de IFN- γ (citocina pró-inflamatória envolvida na resposta de células NK ativadas), a capacidade de células NK murinas, tratadas ou não com as heparinas, em matar células-alvo foi avaliada. Entretanto, nenhuma das heparinas foi capaz de alterar a capacidade citotóxica das células NK murinas (Figura 17A e B). Foi realizado o mesmo tipo de experimento utilizando células NK humanas e células de melanoma humano (linhagem A375), apenas na proporção 1:4 (Figura 17C), mas também não foi encontrada nenhuma alteração. Esses resultados mostram que a heparina e seus derivados dessulfatados não foram

capazes de alterar a capacidade citotóxica de células NK contra células de melanoma.

FIGURA 17 - A HEPARINA E SEUS DERIVADOS NÃO AUMENTAM A CAPACIDADE CITOTÓXICA DE CÉLULAS NK CONTRA CÉLULAS DE MELANOMA



Células NK isoladas de camundongos *wild type* (A) ou *Ncr1^{-/-}* (B) foram cultivadas na presença de 50 ng/mL de rIL-15 e heparina ou de seus derivados (100 µg / mL). Após 24 horas, as células NK foram incubadas com células B16-F10, previamente marcadas com Calcein AM, por 4 horas. A quantificação da morte foi determinada pela intensidade da fluorescência no sobrenadante e comparada ao controle de cada experimento. Cada símbolo nos gráficos de dispersão representa um camundongo individual (com médias e SEM mostrados por barras de erro). Teste-T pareado foi usado para comparar diferenças entre grupos de camundongos. C- Células NK isoladas de sangue de cordão umbilical foram cultivadas na presença de rIL-15 (50 ng/mL) e com ou sem heparina ou seus derivados. Após 24 horas, as células NK foram marcadas com CTV⁻ e co-cultivadas nas células A375 (proporção 1: 4 - células NK: A375). Após 4 horas, as células foram coradas com anexina V e PI e avaliadas por citometria de fluxo. As células A375 viáveis foram consideradas CTV⁻, Anexina V⁻, PI⁻ e células mortas CTV⁻, Anexina V⁺ e PI⁺. Cada ponto representa um experimento independente (realizado em triplicata) e as barras representam o erro padrão da média. O teste t pareado foi utilizado para comparar as diferenças entre os grupos. **Fonte:** o Autor (2020)

6 DISCUSSÃO

O custo estimado para desenvolver um novo fármaco é estimado em mais de 1 bilhão de dólares (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016), por isso a busca por novas funções de drogas “antigas”, para curar novas doenças é uma ideia muito interessante (PUSHPAKOM et al., 2019). Heparina é utilizada na clínica médica desde 1935, principalmente por sua ação anticoagulante (ODUAH; LINHARDT; SHARFSTEIN, 2016). Heparina e LMWH fazem parte das diretrizes para a profilaxia e tratamento de TAC em pacientes oncológicos (FARGE et al., 2019), e muitos estudos, utilizando modelos animais, mostram que a heparina é capaz de reduzir o número de metástases de diversas linhagens tumorais (BORSIG, 2010b; TIEKEN; VERSTEEG, 2016). Entretanto, o uso crônico da heparina pode gerar efeitos colaterais, como hemorragias e trombocitopenia (HWANG; LEE, 2016). Por isso, o uso de derivados da heparina, com reduzida atividade anticoagulante é uma estratégia promissora (LANZI; CASSINELLI, 2018; MOHAMED; COOMBE, 2017). Derivados de heparina também são capazes de reduzir o número de metástases em diversos tipos de modelos tumorais (como cânceres de pulmão, mama, cólon, osteosarcoma e melanoma) utilizando animais (BORSIG, 2010b), e assim como a heparina, o mecanismo de ação para essa redução está relacionado com a inibição da interação de células tumorais com plaquetas (via P-selectina) ou inibição da enzima heparanase (CASU; VLODAVSKY; SANDERSON, 2008; DUCKWORTH et al., 2015; HOSTETTLER et al., 2007; STEVENSON; VARKI; BORSIG, 2007). Entretanto, poucos estudos foram realizados mostrando o efeito direto da heparina ou os seus derivados sobre células tumorais.

Neste trabalho foram realizadas dessulfatações seletivas na estrutura da heparina para obter 3 derivados (DNS, D6OS e D2OS). Foram escolhidas essas modificações químicas porque já foi demonstrado que essas heparinas quimicamente modificadas eram capazes de estimular a síntese do proteoglicano de heparan sulfato (PGHS) em células endoteliais, assim como a heparina não modificada (ROSSI, 2016). É interessante que essas heparinas mantenham esse efeito, porque esse PGHS também apresenta atividade anticoagulante (LIU; PEDERSEN, 2007; SHWORAK et al., 2010). A confirmação das dessulfatações seletivas e a caracterização das heparinas modificadas foram realizadas por análise de RMN-¹³C. Também foi demonstrado, através de análises de HPSEC-MALLS-RI, que os

processos de dessulfatação química não provocaram reduções de tamanho molecular significativas na heparina. A heparina D2OS apresentou um tempo de eluição por HPSEC levemente deslocado para a direita, indicando uma pequena redução na sua massa molar média. Após a confirmação das modificações químicas, a atividade anticoagulante dessas moléculas foi avaliada *in vitro* utilizando o teste aPTT. Esse teste tem como princípio simular a coagulação intrínseca utilizando ativadores do fator XIIa (IGNJATOVIC, 2013). Vale ressaltar que a atividade anticoagulante da heparina é dada por uma sequência pentassacarídica que se liga com alta afinidade à antitrombina (LINDAHL et al., 1980). Os grupos sulfatos são fundamentais para essa interação, sendo que o grau de importância é o seguinte: *N*-sulfato > 6-*O*-sulfato > 2-*O*-sulfato (CASU; NAGGI; TORRI, 2014; LINDAHL et al., 1980). Os resultados da ação anticoagulante das heparinas modificadas realmente mostram que com a remoção do *N*-sulfato a atividade anticoagulante da heparina é drasticamente reduzida (Tabela 1). Já a heparina D6OS apresentou uma melhor atividade anticoagulante quando comparada com a D2OS, que seguindo a lógica da importância dos grupos sulfatos para essa ligação, o resultado esperado deveria ser o inverso. Porém, vale ressaltar que a reação química para gerar o derivado D2OS, também remove o 3-*O*-sulfato da glucosamina (JASEJA et al., 1989), e esse sulfato também é importante para a ligação com a antitrombina (LINDAHL et al., 1980) e já foi demonstrado que após essa modificação química e interação com essa proteína é menor, quando comparada com a ligação da heparina não modificada (RAO et al., 2010).

O passo seguinte foi avaliar o efeito dessas heparinas nas células tumorais. Os resultados obtidos mostraram uma ação promissora das heparinas dessulfatadas em células B16-F10 (de melanoma murino), reduzindo a sua capacidade invasiva e também migratória, com ausência de efeitos citotóxicos para as células. Um ponto importante que deve ser levado em consideração no estudo de tratamentos para o câncer é que, como todos os seres vivos, as células tumorais também estão sujeitas a fatores evolutivos (mutações, deriva, seleção natural) (LIPINSKI et al., 2016). Dessa maneira, tratamentos que matam as células não são interessantes, pois algumas delas irão sobreviver, serão mais resistentes ao tratamento e retomarão o crescimento do tumor (CASÁS-SELVES; DEGREGORI, 2011). Por outro lado, a maioria dos compostos que matam as células tumorais, também acabam matando as células normais, mesmo que em menor intensidade (FALZONE; SALOMONE; LIBRA, 2018).

Um dos resultados *in vitro* mais promissores do presente trabalho foi a redução da capacidade invasiva das células B16-F10, após a exposição aos derivados DNS e D2OS. A invasão é um processo complexo que não está totalmente compreendido, pois envolve diversas alterações bioquímicas nas células e também no microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011, 2000). Esse foi um resultado extremamente interessante, uma vez que o melanoma é um tipo de câncer com uma capacidade invasiva muito elevada (GAGGIOLI; SAHAI, 2007; GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Em um trabalho recente, foi demonstrado que células de melanoma humano (WM-266-4), expostas a 5 UI/mL de LMWH por 72 horas apresentaram uma menor capacidade invasiva e redução do crescimento de tumores *in vitro* (modelo de cultivo 3D utilizando esferoides) (FEATHERBY et al., 2019). Dados anteriores do nosso laboratório também mostram que LMWH (100 µg/mL) foi capaz de reduzir a invasão de células B16-F10 (SANTI, 2015). Além disso, Cai et al. (2019) sabendo que a heparina possui ação antimetastática, mas com alguns efeitos adversos, sintetizaram um glicopolímero composto por dissacarídeos de heparina (70% dos dissacarídeos eram trissulfatados) e metacrilato de poli 2-aminoetil. Esse polímero apresentou baixa ação anticoagulante (50 vezes menos eficaz que a heparina), e foi capaz de reduzir a invasão de células B16-F10 após exposição por 24 horas (256 µg/mL) (CAI et al., 2019).

Após o resultado sobre a redução da capacidade de invasão celular, obtido com os derivados de heparina, o passo seguinte foi investigar as possíveis modulações na expressão de proteínas da membrana das células que estão relacionadas com o processo de invasão, para tentar entender um possível mecanismo de ação para essas moléculas.

Neste sentido foi avaliada a proteína transmembrana CD44, conhecida por ser o receptor para ácido hialurônico (MORATH; HARTMANN; ORIAN-ROUSSEAU, 2016). Essa proteína está intimamente ligada a processos de invasão e migração de vários tipos de canceres, por interagir com metaloproteinases e também na regulação da dinâmica dos filamentos de actina para a migração celular (MORATH; HARTMANN; ORIAN-ROUSSEAU, 2016; SENBANJO; CHELLAIAH, 2017). Redução da proteína CD44 é um dado interessante, pois no melanoma quanto maior a expressão de CD44, menor é a expectativa de vida do paciente (DIETRICH et al., 1997).

O próximo alvo investigado foi o CD147 (também conhecido como basigina ou emmprin). O aumento da expressão dessa molécula está vinculado a um prognóstico ruim do melanoma, uma vez que ela tem função de estimular as células vizinhas (fibroblastos) a produzirem metaloproteinases, além de participar no processo de angiogênese, induzindo as células tumorais e as vizinhas a produzirem VEGF (fator de crescimento vascular) (HU et al., 2017; KANEKURA; CHEN, 2010).

Em seguida foi avaliada possível alteração do PGHS sindecam-1, uma vez que esse proteoglicano pode estar envolvido em processos de metástase e também na transição epitélio-mesênquima (SZATMÁRI et al., 2015). Junto com a E-caderina, a perda da expressão do sindecam-1 indica um aumento da malignidade das células (BAYER-GARNER; SMOLLER, 2001) ou seja, um aumento da expressão desse PGHS após a exposição a heparina ou a seus derivados seria interessante. Vale ressaltar que o anticorpo utilizado reconhece apenas a porção proteica do PHGS, porém a composição das cadeias de GAGs, bem como enzimas que podem modificar essas cadeias, também poderiam ser possíveis alvos de modulação.

Apesar de todas essas moléculas citadas (CD44, CD147 e sindecam-1) estarem relacionadas com o processo de invasão, não foi encontrada nenhuma alteração das células tratadas com heparina ou com um de seus derivados. Outra abordagem futura, que poderá desvendar o mecanismo pelo qual heparina e seus derivados foram capazes de inibir a capacidade de invasão celular é avaliar se o tratamento pode alterar outras moléculas de membrana que são importantes para a adesão celular (integrinas, p.ex.) ou na secreção de enzimas que remodelam a matriz extracelular (MMPs e seus inibidores TIMPs).

Outra dinâmica celular importante que a heparina D2OS alterou foi a migração celular. A migração é processo que contribui para a invasão celular (PAUL; MISTRIOTIS; KONSTANTOPOULOS, 2017). Existem dois tipos de migração celular; a *single cell* - caracterizada por não ter interações célula-célula e ser mais rápida, e a coletiva – caracterizada por ter muitas interações célula-célula e mais lenta (CLARK; VIGNJEVIC, 2015). O melanoma humano, preferencialmente, realiza migração coletiva. Para que ocorra essa migração, a interação das células tumorais com a matriz extracelular também é importante. E esse processo é principalmente mediado por integrina $\beta 1$ (HEGERFELDT et al., 2002). O ensaio utilizado para a migração nesse trabalho (*scratch*) é um método utilizado para avaliar a migração coletiva das células (PIJUAN et al., 2019). Essa interação célula-matriz extracelular está

relacionada com a ativação de duas vias de sinalização: da proteína FAK (*focal adhesion kinase*) ou de PKC (*protein kinase C*). Essas vias de sinalização estão relacionadas com reorganização do citoesqueleto e migração de células de melanoma (KOLLI-BOUHAFS et al., 2014; OKA; KIKKAWA, 2005). Células de melanoma humano (M5) expostas à heparina apresentam uma redução da ativação de FAK, e consequentemente uma menor migração (CHALKIADAKI et al., 2011a). Essa mesma linhagem celular exposta a LMWH também apresentou uma redução na migração, porém sem alterações na ativação de FAK, mas com uma redução na atividade de PKC (CHALKIADAKI et al., 2011b). Essas duas vias de sinalização poderiam ser investigadas para compreender melhor os efeitos de D2OS nas células B16-F10.

Vale ressaltar que muitos grupos de pesquisa teriam desprezado esses compostos testados pelo fato de que eles não apresentaram ação citotóxica, porém o nosso grupo de pesquisa, nos últimos anos, tem se dedicado a buscar compostos que não matam as células, mas que são capazes de alterar parâmetros de malignidade. Neste sentido, destaca-se o trabalho de Biscaia e colaboradores (2017), os quais demonstraram que uma manogalactana parcialmente metilada extraída do fungo *Pleurotus eryngii* também não teve um efeito citotóxico nas células B16-F10, mas foi capaz de reduzir a invasão dessas células e ainda teve efeito *in vivo* reduzindo cerca de 60% do crescimento de tumores subcutâneos, sem causar danos à saúde do animal (BISCAIA et al., 2017). Especificamente, sobre polissacarídeos sulfatados, destaca-se recente o trabalho publicado por Bellan et al., (2020), que mostraram que uma heteroramnana sulfatada extraída da alga verde *Gayralia brasiliensis*, também não foi citotóxica para células B16-F10, mas reduziu a capacidade migratória e invasiva dessas células (BELLAN et al., 2020). LMWH e Fucanas também mostraram que esses compostos sulfatados, na concentração de até 100 mg/mL, não são citotóxicos, mas são capazes de reduzir a invasão celular (FERREIRA, 2012; SANTI, 2015).

A literatura também traz outros trabalhos, com polissacarídeos sulfatados que também apresentaram resultados promissores em células tumorais, sem efeitos citotóxicos. Um outro polissacarídeo sulfatado também apresentou promissores resultados em células tumorais sem efeitos citotóxicos. Uma xilofucoglucuronana extraída de *Ascophyllum nodosum* não foi citotóxica para células B16-F10 (exposições de 24 horas, em uma faixa de concentração de 1 a 1000 µg/mL), mas foi

capaz de reduzir a migração (com 100 e 1000 µg/mL) e a invasão (com 5; 10 e 20 µg/mL) (ABU et al., 2015).

Dentre as heparinas testadas, o derivado D2OS apresentou os melhores resultados *in vitro* (redução da migração e invasão) e ainda manteve uma baixa atividade anticoagulante. Além disso, previamente já foi demonstrado (*in vitro*) que o uso desse derivado não levava a um dos principais efeitos colaterais da heparina, a trombocitopenia (RAO et al., 2010). Desta forma, esse derivado foi selecionado para avaliar os seus efeitos antitumorais *in vivo*, utilizando dois modelos em camundongos C57BL/6: tumor sólido (injeção subcutânea de células B16F10) e colonização pulmonar (injeção intravenosa de células B16F10). Utilizando uma dose de 10 mg/kg (injeções em dias alternados, via s.c) não foi observada alteração no crescimento do tumor subcutâneo ou na quantidade de metástases nos pulmões dos camundongos. Rao e colaboradores mostraram que o derivado D2OS, na dose de 30 mg/kg, diminuiu o número de metástases em camundongos injetados com células B16-F10 e ainda aumentou a sobrevida dos mesmos (RAO et al., 2010). Em outro trabalho, Lapierre et al., (1996) também observaram um aumento da sobrevida em camundongos tratados com o mesmo derivado (50 mg/kg) (LAPIERRE et al., 1996). Vale ressaltar que, nos dois trabalhos citados, o tratamento foi realizado 30 minutos antes da inoculação das células, isto é, uma abordagem preventiva. No presente trabalho estávamos investigando uma abordagem terapêutica, iniciando o tratamento 24 horas após a inoculação das células. É possível que não tenhamos visto nenhum efeito *in vivo*, porque a dose escolhida foi baixa, como será melhor discutido posteriormente.

Como esperado, a heparina não modificada foi capaz de reduzir o número de metástases nos pulmões, como já foi demonstrado por outros autores (BERECZKY et al., 2005; LAPIERRE et al., 1996). Após a dessulfatação, o derivado D2OS possivelmente perde ou tem uma menor interação com os alvos moleculares da heparina, os quais parecem ser importantes para a redução no número de metástases.

Células tumorais possuem uma grande expressão de fator tecidual (TF), essa expressão está relacionada com um aumento de coagulação, crescimento tumoral e metástases (RAK et al., 2006). TF é uma proteína transmembrana que se liga ao fator VII/VIIa, que por sua vez ativa o fator Xa e IXa (PAWLINSKI; MACKMAN, 2008). Células de melanoma humano produzem 1000 vezes mais TF que melanócitos e quando pré-incubadas com anticorpo anti-TF e posteriormente inoculadas em

camundongos *SCID* (sem sistema imunológico) não são capazes de estabelecer metástases no pulmão (MUELLER et al., 1992). Células B16-F10 transfectadas com a proteína inibidora de TF (TFPI) e injetadas em camundongos apresentaram uma redução no número de metástases, porém, não foram eficientes para reduzir o crescimento do tumor subcutâneo (AMIRKHOSRAVI et al., 2002). De Oliveira e colaboradores (2012) trataram camundongos C57BL/6 inoculados com B16-F10 (i.v ou sc) com uma proteína anticoagulante que bloqueia TF (Ixolaris), observaram uma redução no número de metástases pulmonares e também no peso dos tumores subcutâneos. Heparina pode interagir com o TFPI e aumentar a sua atividade de inibição do fator Xa, porém com a remoção do 2-O sulfato da heparina essa atividade é reduzida (YE et al., 1998). Portanto, a redução no número de metástases causado pela heparina pode estar relacionada com a sua interação com TFPI ou outros fatores da cascata de coagulação.

Além de interação com integrina, a heparina pode reduzir o número de metástases através da sua interação com a P-selectina presentes em plaquetas (LÄUBLI; BORSIG, 2010). Já foi demonstrado que camundongos que não expressam P-selectina, desenvolvem menos metástases pulmonares quando células B16-F10 são inoculadas (LUDWIG et al., 2004). A heparina pode se ligar a P-selectina, impedindo essa interação com as células tumorais (BORSIG, 2010a). Entretanto, ainda não está bem definido se heparinas D2OS apresentam uma menor interação (HOSTETTLER et al., 2007) ou mantém a interação com P-selectina (WEI et al., 2005). Essa baixa interação do derivado D2OS com as moléculas citadas (TF, integrina- β 1 e P-selectina) poderia justificar a ausência de efeito (na dose de 10 mg/kg) desse derivado na redução das metástases pulmonares.

Mesmo sem apresentar alteração no crescimento dos tumores subcutâneos, foi avaliada a infiltração de linfócitos T e células NK nos tumores. O aumento da infiltração de linfócitos está relacionado com um bom prognóstico para pacientes com melanoma (CLEMENTE et al., 1996). Desta forma, foi avaliado se os tratamentos com heparinas alteravam o padrão de infiltração de linfócitos. Porém, não foi encontrada nenhuma diferença na quantidade de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) nem de células NK nos tumores dos grupos tratados em relação aos tumores do grupo controle. Devido ao microambiente tumoral, células NK não são eficientes em combater tumores sólidos (CHEN et al., 2019; NAVARRO; BJÖRKLUND; CHEKENYA, 2015). O microambiente tumoral produz diversas moléculas que têm um efeito inibitório em

células NK, essas moléculas incluem: galectinas (1, 3 e 9), ácidos siálico e hialurônico (ROSSI; TRINDADE; SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, 2020). Além disso, o pH do interior de tumores sólidos é baixo que o de um tecido normal, devido ao metabolismo das células tumorais (SONG; PARK; ROSS, 1999). Esse pH ácido altera o metabolismo das células NK e diminui a sua capacidade citotóxica (KOBAYASHI; MATTAROLLO, 2017). Em contrapartida, células NK possuem ação efetiva na instalação de metástases no modelo de colonização pulmonar (KRASNOVA et al., 2017). Por isso foi investigado se a heparina ou seus derivados possuíam alguma ação nas propriedades de ativação dessas células. As células tumorais recrutam plaquetas para aumentar a angiogênese e inflamação (FALANGA; PANOVA-NOEVA; RUSSO, 2009). Esse recrutamento também formam uma camada protetora nas células tumorais, protegendo essas células do reconhecimento e eliminação por células NK (PLACKE; KOPP; SALIH, 2011). Curiosamente, quando células NK são depletadas de camundongos C57BL/6 (com anticorpo anti-Asilo-GM1), a heparina perde a sua capacidade de reduzir metástases causadas por células B16-F10 (GORELIK, 1987). Como parece existir uma relação entre heparina e células NK foi investigado se a heparina ou seus derivados eram capazes de, além de impedir o escudo de plaquetas, ativar as células NK. Essas células foram escolhidas como alvo porque alguns dos receptores responsáveis pela ação citotóxica dessas células (NKp30, NKp44 e NKp46) (CHIOSSONE et al., 2018) são ligantes de heparan sulfato/heparina (HECHT et al., 2009; ZILKA et al., 2005). Além disso, foi observado que o uso de LMWH potencializa o efeito de imunoterápicos em camundongos inoculados com células de câncer pancreático (KARAMOUZIS et al., 2019). Por isso, heparina e seus derivados poderiam apresentar uma ação estimuladora em células NK.

O primeiro teste nessas células foi avaliar a produção de IFN- γ . A produção dessa citocina é um marcador clássico da ativação de células NK (SOUZA-FONSECA-GUIMARAES; ADIB-CONQUY; CAVAILLON, 2012). Não foi observada nenhuma produção de IFN- γ pelas células NK, após exposição durante 24 horas a heparina ou seus derivados. Entretanto, quando as células NK foram expostas as citocinas IL-12 e IL-18, que estimulam a produção de IFN- γ (VIVIER et al., 2018), a heparina (apenas nas células NK humanas) e seus derivados (células NK humanas e murinas) potencializaram o seu efeito. Um outro trabalho mostrou que quando a

linhagem de células NK humanas (NK-92MI) foram expostas a heparina e IL-12, também ocorreu um aumento na produção de IFN- γ (JAYANTHI et al., 2017). Uma possível explicação para esse fato é que a citocina IL-12 interage com a heparina (HASAN et al., 1999) e aparentemente, mesmo após a heparina ser dessulfatada, essa interação se mantém. Também foi avaliado se após serem expostas a heparina e seus derivados, as células NK seriam mais citotóxicas para células de melanoma, porém nenhuma diferença foi encontrada. Um outro trabalho mostrou que um polissacarídeo sulfatado rico em manose, extraído da alga verde *Codium fragile* foi capaz de aumentar a proliferação de uma linhagem humana de células NK (NK-92). E após a exposição por 24 horas ao polissacarídeo (100 $\mu\text{g/mL}$) houve um aumento na citotoxicidade contra células de adenocarcinoma de cervical (HeLa) (SURAYOT; YOU, 2017). Apesar dos receptores NKp30, NKp44 e NKp46 serem ligantes de heparina (HECHT et al., 2009; ZILKA et al., 2005), não parece que seja o suficiente para ativar as células NK, vale ressaltar, que esse receptores podem estar com o sítio de interação ocupado por alguma cadeia de heparam sulfato, presente em algum proteoglicano presente na superfície das células NK ou na matriz extracelular, como já foi descrito para o receptor NKp44 (BRUSILOVSKY et al., 2015). Esses dados mostram que a heparina ou seus derivados não parecem ter um efeito direto sobre as células NK, porém, o fato de impedir o recrutamento de plaquetas é extremamente importante para a eliminação das células tumorais pelo sistema imune.

Mesmo sem apresentar um efeito *in vivo*, o derivado D2OS continua sendo uma molécula promissora que merece continuar a se investigar os seus efeitos, uma vez que ela apresentou ótimos resultados *in vitro*. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostram que um polissacarídeo sulfatado, conhecido como fucana A (extraído da alga *Spatoglossun schröderi*) também foi capaz de reduzir a migração e invasão de células B16-F10 utilizando ensaios *in vitro* (SANTI, 2015). Em seguida a sua ação terapêutica foi avaliada *in vivo*, utilizando camundongos com tumores subcutâneos previamente estabelecidos. Várias doses foram testadas (15; 30 e 100 mg/kg), entretanto, apenas a dose de 100 mg/kg foi efetiva para o tratamento terapêutico. No mesmo trabalho também foi testado um tratamento profilático com a Fucana A. Foram realizados tratamentos diários (30 mg/kg) iniciando 48 horas antes da inoculação das células B16-F10 (após a inoculação, os tratamentos continuaram diariamente até o 14º dia, com eutanásia no 15º dia, no modelo de tumor subcutâneo ou até o 20º dia, com eutanásia no 21º dia, no modelo de metástase pulmonar). Essa

estratégia de tratamento foi efetiva para reduzir o crescimento do tumor subcutâneo e também para diminuir o número de metástases nos pulmões (BINI, 2018). Esses dados prévios do nosso grupo e os dados da literatura, onde tratamento profilático com o derivado D2OS foi capaz de reduzir metástases em camundongo com doses de 30 mg/kg (RAO et al., 2010) e 50 mg/kg (LAPIERRE et al., 1996) nos sugerem que o derivado possa ter uma melhor resposta no modelo *in vivo* utilizando doses maiores, uma vez que no presente trabalho foi adotada apenas a dose de 10 mg/kg. Desta forma, abrem-se novas frentes de estratégias experimentais para serem avaliadas as ações terapêuticas e/ou profiláticas dos derivados dessulfatados de heparina.

Apesar de na literatura existirem trabalhos que mostram a interação de heparina e seus derivados com alguns receptores de células NK (HECHT et al., 2009; ZILKA et al., 2005) essa foi a primeira vez que foram feitos testes sistemáticos para avaliar um possível efeito dessas moléculas em células NK. Também, foi a primeira vez que foi demonstrado o efeito direto dessas moléculas sobre células de melanoma murino (B16-F10), mostrando que elas são capazes de modular o perfil de malignidade dessas células.

7 CONCLUSÕES

Heparina e seus derivados dessulfatados não provocaram alterações significativas na viabilidade, na proliferação e na morfologia das células de melanoma murino B16-F10. No entanto, dois dos três derivados testados (D2OS e DNS) foram capazes de reduzir em cerca de 40% a capacidade invasiva das células tumorais de melanoma B16-F10, e D2OS também reduziu a migração dessas células. Apesar dos resultados promissores com D2OS *in vitro*, essa molécula não foi capaz de reduzir o crescimento tumoral, nem o número de focos metastáticos *in vivo*, na dose testada (10 mg/kg). Entretanto, a heparina não modificada, que não havia apresentado resultado promissor *in vitro*, foi capaz de reduzir o número de metástases no pulmão, mostrando que a ação anticoagulante ou sistêmica da heparina possa ser importante para esse efeito. Mais testes devem ser feitos com doses maiores de D2OS para investigar se tem ação antitumoral *in vivo*, mas sem causar, ou pelo menos com mínimos efeitos colaterais

Heparina e seus derivados quimicamente modificados aumentam a sobrevivência de células NK (murinas) em cultura mas não alteram a sua proliferação e ativação (produção de IFN- γ , degranulação e capacidade citotóxica contra células

de melanoma). Porém, heparina e seus derivados foram capazes de potencializar o efeito das citocinas IL-12 e IL-18 na produção de IFN- γ . Conclui-se que apesar das células NK possuírem receptores passíveis de se ligar à heparina, essa interação não é suficiente para a estimulação de células NK.

REFERÊNCIAS

- ABDOL, N. R. et al. Cancer-Associated Thrombosis: An Overview of Mechanisms, Risk Factors, and Treatment. **Cancers**, v. 10, n. 10, p. 380, 11 out. 2018.
- ABU, R. et al. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 4, p. 727–732, mar. 2015.
- AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, jun. 2015.
- ALEXANDROV, L. B. et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. v. 578, n. May 2018, 2020.
- ALYAHYA, R. et al. Anti-metastasis efficacy and safety of non-anticoagulant heparin derivative versus low molecular weight heparin in surgical pancreatic cancer models. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 3, p. 1225–1231, 2015.
- AMARAL, T. et al. The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I – Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. **European Journal of Cancer**, v. 73, p. 85–92, mar. 2017.
- AMIRKHOSRAVI, A. et al. Tissue Factor Pathway Inhibitor Reduces Experimental Lung Metastasis of B16 Melanoma. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 87, n. 06, p. 930–936, 8 dez. 2002.
- AREPALLY, G. M. Heparin-induced thrombocytopenia. **Blood**, v. 129, n. 21, p. 2864–2872, 25 maio 2017.
- BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 1 dez. 2012.
- BATUS, M. et al. Optimal management of metastatic melanoma: current strategies and future directions. **Am J Clin Dermatol**, v. 14, n. 3, p. 179–194, 2014.
- BAYER-GARNER, I. B.; SMOLLER, B. R. The expression of syndecan-1 is preferentially reduced compared with that of E-cadherin in acantholytic squamous cell carcinoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 28, n. 2, p. 83–89, 2001.
- BELLAN, D. L. et al. Non-Cytotoxic Sulfated Heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* Green Seaweed Reduces Driver Features of Melanoma Metastatic Progression. **Marine Biotechnology**, 22 jan. 2020.
- BERECZKY, B. et al. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 22, n. 1, p. 69–76, 2005.
- BINI, I. H. **Avaliação da ação antitumoral in vivo de fucana A em melanoma murino**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2018.
- BISCAIA, S. M. P. et al. Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, n. September, p. 95–104, dez. 2017.
- BOBEK, V.; KOVAŘÍK, J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 58, n. 4, p. 213–219, 2004.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n. 1, p. 7–9, mar. 1985.
- BORSIG, L. Heparin as an Inhibitor of Cancer Progression. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2010a. v. 1173p. 335–349.
- BORSIG, L. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. **Thrombosis Research**, v. 125, p. S66–S71, abr. 2010b.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRUSILOVSKY, M. et al. Regulation of natural cytotoxicity receptors by heparan sulfate proteoglycans in -cis : A lesson from NKp44. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 4, p. 1180–1191, abr. 2015.

CAI, Z. et al. Design and synthesis of a native heparin disaccharide grafted poly-2-aminoethyl methacrylate glycopolymer for inhibition of melanoma cell metastasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 612–619, 2019.

CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Re-visiting the structure of heparin. **Carbohydrate Research**, v. 403, p. 60–68, 2014.

CASU, B.; VLODAVSKY, I.; SANDERSON, R. D. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 36, n. 3–4, p. 195–203, 2008.

CHALKIADAKI, G. et al. Heparin plays a key regulatory role via a p53/FAK-dependent signaling in melanoma cell adhesion and migration. **IUBMB Life**, v. 63, n. 2, p. n/a-n/a, 2011a.

CHALKIADAKI, G. et al. Low molecular weight heparin inhibits melanoma cell adhesion and migration through a PKCa/JNK signaling pathway inducing actin cytoskeleton changes. **Cancer Letters**, v. 312, n. 2, p. 235–244, 2011b.

CHEN, Z. et al. Strategies to Augment Natural Killer (NK) Cell Activity against Solid Tumors. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 1040, 23 jul. 2019.

CHIOSSONE, L. et al. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 11, p. 671–688, 12 nov. 2018.

CLARK, A. G.; VIGNJEVIC, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 36, p. 13–22, 2015.

CLEMENTE, C. G. et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 77, n. 7, p. 1303–1310, 1 abr. 1996.

DARVIN, P. et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 12, p. 165, 13 dez. 2018.

DAVEY, R. J.; WESTHUIZEN, A. VAN DER; BOWDEN, N. A. Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 242–253, fev. 2016.

DAVIS, E. J. et al. Melanoma: What do all the mutations mean? **Cancer**, v. 124, n. 17, p. 3490–3499, 2018.

DE OLIVEIRA, A. D. S. et al. Inhibition of tissue factor by ixolaris reduces primary tumor growth and experimental metastasis in a murine model of melanoma. **Thrombosis Research**, v. 130, n. 3, p. e163–e170, set. 2012.

DE SANTANA-FILHO, A. P. et al. GC–MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2730–2734, mar. 2012.

DIETRICH, A. et al. High CD44 surface expression on primary tumours of malignant melanoma correlates with increased metastatic risk and reduced survival. **European Journal of Cancer Part A**, v. 33, n. 6, p. 926–930, 1997.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, p. 20–33, 2016.

DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and**

Therapy, v. Volume 7, p. 35–49, jun. 2018.

DONG, R. et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 2, p. 599–614, 5 dez. 2017.

DUCKWORTH, C. A. et al. Chemically modified, non-anticoagulant heparin derivatives are potent galectin-3 binding inhibitors and inhibit circulating galectin-3-promoted metastasis. **Oncotarget**, v. 6, n. 27, p. 23671–87, 2015.

EGGERMONT, A. M. M.; ROBERT, C. New drugs in melanoma: It's a whole new world. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 14, p. 2150–2157, set. 2011.

FALANGA, A.; MARCHETTI, M.; VIGNOLI, A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 2, p. 223–233, fev. 2013.

FALANGA, A.; PANOVA-NOEVA, M.; RUSSO, L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 22, n. 1, p. 49–60, mar. 2009.

FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, 13 nov. 2018.

FARGE, D. et al. 2019 international clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 10, p. e566–e581, out. 2019.

FARHAD, M.; ROLIG, A. S.; REDMOND, W. L. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. **Oncolimmunology**, v. 7, n. 6, p. 1–8, 2018.

FEATHERBY, S. et al. Low molecular weight heparin and direct oral anticoagulants influence tumour formation, growth, invasion and vascularisation by separate mechanisms. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6272, 18 dez. 2019.

FERREIRA, V. H. C. **Avaliação da atividade biológica de polissacarídeos sulfatados sobre modelo de melanoma murino “ in vitro ”**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2012.

GAGGIOLI, C.; SAHAI, E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. **Pigment Cell Research**, v. 20, n. 3, p. 161–172, jun. 2007.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chemical biology & drug design**, v. 72, n. 6, p. 455–82, dez. 2008.

GOHJI, K. et al. Expression of three extracellular matrix degradative enzymes in bladder cancer. **International Journal of Cancer**, v. 95, n. 5, p. 295–301, 20 set. 2001.

GOMES, A. M. et al. Unique extracellular matrix heparan sulfate from the bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) safely inhibits arterial thrombosis after photochemically induced endothelial lesion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7312–7323, 2010.

GOMES, A. M. et al. Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin analog from the mollusk *Nodipecten nodosus*: Effect on P-selectin, heparanase, metastasis and cellular recruitment. **Glycobiology**, v. 25, n. 4, p. 386–393, 1 abr. 2015.

GORANTLA, V. C.; KIRKWOOD, J. M. State of Melanoma. An Historic Overview of a Field in Transition. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 415–435, 2014.

GORELIK, E. Augmentation of the antimetastatic effect of anticoagulant drugs

by immunostimulation in mice. **Cancer Research**, v. 47, n. 3, p. 809–815, 1987.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

GUERRINI, M.; BISIO, A.; TORRI, G. Combined Quantitative ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Characterization of Heparin Preparations. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 27, n. 05, p. 473–482, 2001.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

HASAN, M. et al. IL-12 is a heparin-binding cytokine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 2, p. 1064–70, 15 jan. 1999.

HAWKINS, E. D. et al. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2057–2067, 2007.

HECHT, M. L. et al. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 2, p. 712–720, 2009.

HEGERFELDT, Y. et al. Collective cell movement in primary melanoma explants: Plasticity of cell-cell interaction, β 1-integrin function, and migration strategies. **Cancer Research**, v. 62, n. 7, p. 2125–2130, 2002.

HÖÖK, M.; WASTESON, Å.; OLDBERG, Å. A heparan sulfate-degrading endoglycosidase from rat liver tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, n. 4, p. 1422–1428, 1975.

HORROW, J. C. Protamine: A review of its toxicity. **Anesthesia and Analgesia**, v. 64, n. 3, p. 348–361, 1985.

HOSTETTLER, N. et al. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. **FASEB Journal**, v. 21, n. 13, 2007.

HU, X. et al. Repressing CD147 is a novel therapeutic strategy for malignant melanoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 15, p. 25806–25813, 11 abr. 2017.

HUNTINGTON, N. D.; VOSSHENRICH, C. A. J.; DI SANTO, J. P. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 703–714, 2007.

HWANG, H. H.; LEE, D. Y. Antiangiogenic actions of heparin derivatives for cancer therapy. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 9, p. 767–772, 3 set. 2016.

IGNJATOVIC, V. Activated Partial Thromboplastin Time. In: MONAGLE, P. (Ed.). **Haemostasis: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. v. 992p. 111–120.

INCA. **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322#>. Acesso em: 27 abr. 2016.

INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l.: s.n.].

JASEJA, M. et al. Novel regio- and stereoselective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 1449–1456, 1 set. 1989.

JAYANTHI, S. et al. Modulation of Interleukin-12 activity in the presence of heparin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5360, 13 dez. 2017.

KALBASI, A.; RIBAS, A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 1, p. 25–39, 30 jan. 2020.

KANEKURA, T.; CHEN, X. CD147/basigin promotes progression of malignant

melanoma and other cancers. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, n. 3, p. 149–154, mar. 2010.

KANEVSKIY, L. M. et al. Lipopolysaccharide induces IFN- γ production in human NK cells. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JAN, p. 1–10, 2013.

KHAN, T. et al. Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, n. January, p. 412–428, abr. 2019.

KOBAYASHI, T.; MATTAROLLO, S. R. Natural killer cell metabolism. **Molecular Immunology**, n. November, p. 0–1, 2017.

KOLLI-BOUHAFS, K. et al. FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 8, p. 1–10, 2014.

KOZAR, I. et al. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 2, p. 313–322, abr. 2019.

KRASNOVA, Y. et al. Bench to bedside: NK cells and control of metastasis. **Clinical Immunology**, v. 177, p. 50–59, 2017.

LANZI, C.; CASSINELLI, G. **Heparan sulfate mimetics in cancer therapy: The challenge to define structural determinants and the relevance of targets for optimal activity**. [s.l: s.n.]. v. 23

LAPIERRE, F. et al. Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory, angiostatic, anti-tumor and anti-metastatic properties. **Glycobiology**, v. 6, n. 3, p. 355–66, abr. 1996.

LÄUBLI, H.; BORSIG, L. Selectins promote tumor metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 20, n. 3, p. 169–177, jun. 2010.

LI, J.-P. Heparin, Heparan Sulfate and Heparanase in Cancer: Remedy for Metastasis? **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 64–76, 2008.

LINDAHL, U. et al. Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 11, p. 6551–6555, 1 nov. 1980.

LIU, J. et al. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 563, n. 4, p. 13–21, dez. 2014.

LÓPEZ-SOTO, A. et al. Control of Metastasis by NK Cells. **Cancer Cell**, v. 32, n. 2, p. 135–154, ago. 2017.

LORENZO-HERRERO, S. et al. CD107a Degranulation Assay to Evaluate Immune Cell Antitumor Activity. In: [s.l: s.n.]. v. 1884p. 119–130.

LUDWIG, R. J. et al. Endothelial P-Selectin as a Target of Heparin Action in Experimental Melanoma Lung Metastasis. **Cancer Research**, v. 64, n. 8, p. 2743–2750, 2004.

LUEBKER, S. A.; KOEPESELL, S. A. Diverse Mechanisms of BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma Identified in Clinical and Preclinical Studies. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 17 abr. 2019.

MARIN-ACEVEDO, J. A. et al. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: New developments and challenges. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2018.

MAVERAKIS, E. et al. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. **Acta Dermato Venereologica**, v. 95, n. 5, p. 516–524, 2015.

MENZIES, A. M.; LONG, G. V. Systemic treatment for BRAF-mutant melanoma: where do we go next? **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 9, p. e371–e381, ago. 2014.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006.

MOHAMED, S.; COOMBE, D. Heparin Mimetics: Their Therapeutic Potential.

Pharmaceuticals, v. 10, n. 4, p. 78, 2 out. 2017.

MORATH, I.; HARTMANN, T. N.; ORIAN-ROUSSEAU, V. CD44: More than a mere stem cell marker. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 81, p. 166–173, dez. 2016.

MUELLER, B. M. et al. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 24, p. 11832–11836, 15 dez. 1992.

MULLOY, B. et al. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 1, p. 76–141, 15 dez. 2016.

MULLOY, B.; GRAY, E.; BARROWCLIFFE, T. Characterization of Unfractionated Heparin: Comparison of Materials from the last 50 Years. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 84, n. 12, p. 1052–1056, 13 dez. 2000.

MUÑOZ-GARCÍA, J. C. et al. Effect of the Substituents of the Neighboring Ring in the Conformational Equilibrium of Iduronate in Heparin-like Trisaccharides. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 51, p. 16319–16331, 14 dez. 2012.

NAGGI, A. et al. Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded N -Acetylation, and Glycol Splitting. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12103–12113, 1 abr. 2005.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 3, p. 899–909, 2000.

NAVARRO, A. G.; BJÖRKLUND, A. T.; CHEKENYA, M. Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. APR, 2015.

NIERS, T. M. H. et al. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, n. 3, p. 195–207, 2007.

ODUAH, E.; LINHARDT, R.; SHARFSTEIN, S. Heparin: Past, Present, and Future. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 38, 4 jul. 2016.

OGISHIMA, T. et al. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1028–36, 1 fev. 2005.

OGREN, S.; LINDAHL, U. Cleavage of macromolecular heparin by an enzyme from mouse mastocytoma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 7, p. 2690–2697, 1975.

OKA, M.; KIKKAWA, U. Protein kinase C in melanoma. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, n. 2, p. 287–300, 2005.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. **B16 as a Mouse Model for Human Melanoma**. [s.l: s.n.].

PALUNCIC, J. et al. Roads to Melanoma: Key Pathways and Emerging Players in Melanoma Progression and Oncogenic Signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 4, p. 770–784, 2016.

PAUL, C. D.; MISTRITIS, P.; KONSTANTOPOULOS, K. Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 131–140, 2 fev. 2017.

PAWLINSKI, R.; MACKMAN, N. Use of Mouse Models to Study the Role of Tissue Factor in Tumor Biology. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 34, n. 02, p. 182–186, mar. 2008.

PIJUAN, J. et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n.

June, p. 1–16, 14 jun. 2019.

PLACKE, T.; KOPP, H. G.; SALIH, H. R. Modulation of natural killer cell anti-tumor reactivity by platelets. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 4, p. 374–382, 2011.

PRIETO, V. G. et al. Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 22, p. 6709–6715, 2006.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 12 jan. 2019.

RAK, J. et al. Tissue factor in cancer and angiogenesis: The molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 32, n. 1, p. 54–69, 2006.

RAO, N. V. et al. Low anticoagulant heparin targets multiple sites of inflammation, suppresses heparin-induced thrombocytopenia, and inhibits interaction of RAGE with its ligands. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 299, n. 1, p. C97–C110, jul. 2010.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, jun. 2008.

ROSSI, G. R. **Avaliação dos requisitos estruturais e sítios de ligação da molécula de heparina para o estímulo da síntese do proteoglicano de heparam sulfato**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2016.

ROSSI, G. R.; TRINDADE, E. S.; SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F. Tumor Microenvironment-Associated Extracellular Matrix Components Regulate NK Cell Function. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 29 jan. 2020.

RUDD, T. R. et al. Comparable stabilisation, structural changes and activities can be induced in FGF by a variety of HS and non-GAG analogues: implications for sequence-activity relationships. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 8, n. 23, p. 5390–7, 7 dez. 2010.

SANTI, F. C. **Avaliação das alterações moleculares causadas por polissacarídeos sulfatados em modelo de melanoma “in vitro”**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2015.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 28 jul. 2012.

SENBANJO, L. T.; CHELLAIAH, M. A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. March, 7 mar. 2017.

SHARMA, A. et al. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. **Cancer Research**, v. 65, n. 6, p. 2412–2421, 2005.

SONG, C. W.; PARK, H.; ROSS, B. D. Intra- and Extracellular pH in Solid Tumors. In: **Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy**. Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 51–64.

SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F.; ADIB-CONQUY, M.; CAVAILLON, J. M. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 18, n. 1, p. 270–285, 2012.

SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F.; CURSONS, J.; HUNTINGTON, N. D. The Emergence of Natural Killer Cells as a Major Target in Cancer Immunotherapy. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 2, p. 142–158, 2019.

SPARSA, A. et al. High prevalence and risk factors of thromboembolism in

stage IV melanoma. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 3, p. 340–344, 2011.

STEVENSON, J. L.; VARKI, A.; BORSIG, L. Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects. **Thrombosis Research**, v. 120, n. SUPPL. 2, p. 107–111, 2007.

SZATMÁRI, T. et al. Syndecan-1 in Cancer: Implications for Cell Signaling, Differentiation, and Prognostication. **Disease Markers**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

TIEKEN, C.; VERSTEEG, H. H. Anticoagulants versus cancer. **Thrombosis Research**, v. 140, p. S148–S153, abr. 2016.

TOMAYKO, M. M.; REYNOLDS, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 148–154, set. 1989.

TRINDADE, E. S. et al. The binding of heparin to the extracellular matrix of endothelial cells up-regulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate proteoglycan. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 2, p. 328–337, nov. 2008.

VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Melanoma and the tumor microenvironment. **Current Oncology Reports**, v. 10, n. 5, p. 439–446, 2008.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44–49, 2011.

VIVIER, E. et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. **Cell**, v. 174, n. 5, p. 1054–1066, 2018.

VLODAVSKY, I. et al. Mammalian heparanase: Gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 5, n. 7, p. 793–802, 1 jul. 1999.

VORNICOVA, O. et al. The prognostic significance of heparanase expression in metastatic melanoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p. 74678–74685, 15 nov. 2016.

WARDROP, D.; KEELING, D. The story of the discovery of heparin and warfarin. **British journal of haematology**, v. 141, n. 6, p. 757–63, jun. 2008.

WEI, M. et al. Selectively desulfated heparin inhibits P-selectin-mediated adhesion of human melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 229, n. 1, p. 123–126, 2005.

WELSH, S. J. et al. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? **European Journal of Cancer**, v. 62, p. 76–85, jul. 2016.

WHO. WHO Model List of Essential Medicines. v. 19, ago. 2015.

WORKMAN, P. et al. How Much Longer Will We Put Up With 100,000 Cancer Drugs? **Cell**, v. 168, n. 4, p. 579–583, 2017.

YATES, E. A. et al. ¹H and ¹³C NMR spectral assignments of the major sequences of twelve systematically modified heparin derivatives. **Carbohydrate research**, v. 294, p. 15–27, 20 nov. 1996.

YE, Z. et al. Structural Requirements of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) and Heparin for TFPI-Heparin Interaction. **Thrombosis Research**, v. 89, n. 6, p. 263–270, mar. 1998.

YU, C. et al. Combination of immunotherapy with targeted therapy: Theory and practice in metastatic melanoma. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, 2019.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.-P.; MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2381–2391, out. 2008.

ZILKA, A. et al. Characterization of the heparin/heparan sulfate binding site of the natural cytotoxicity receptor NKp46. **Biochemistry**, v. 44, n. 44, p. 14477–14485, 2005.