

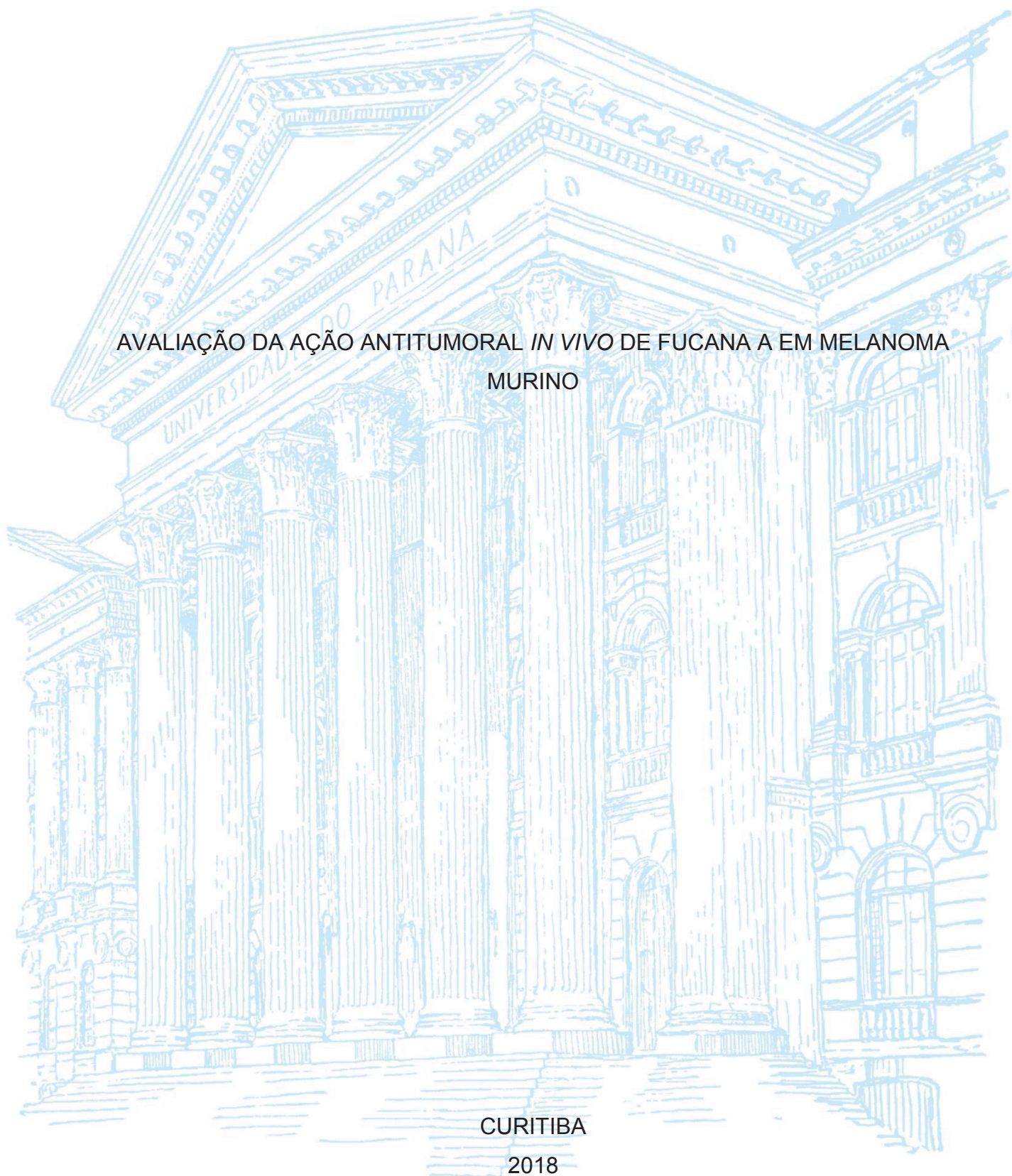
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISRAEL HENRIQUE BINI

AValiação da ação antitumoral *in vivo* de fucana A em melanoma
MURINO

CURITIBA

2018



ISRAEL HENRIQUE BINI

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL *IN VIVO* DE FUCANA A EM MELANOMA
MURINO

Dissertação 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 Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

Coorientadora: Dra. Stellee Marcela Petris Biscaia

CURITIBA

2018

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

Bini, Israel Henrique

Avaliação da ação antitumoral *in vivo* de fucana A em melanoma murino./ Israel Henrique Bini. – Curitiba, 2018. 77 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade

Coorientadora: Stellee Marcela Petris Biscaia

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

1. Melanoma. 2. Pele – Cancer. 3. Polissacarídeos. I. Título. II. Trindade, Edvaldo da Silva. III. Biscaia, Stellee Marcela Petris. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 547.782



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

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 Dissertação de Mestrado de **ISRAEL HENRIQUE BINI** intitulada: **AValiação DA AÇÃO ANTITUMORAL *IN VIVO* DE FUCANA A EM MELANOMA MURINO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 28 de Agosto de 2018.

EDVALDO DA SILVA TRINDADE
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER
Avaliador Externo (UFPR)

MICHEL FLEITH OTUKI
Avaliador Externo (UFPR)



Dedico este trabalho à minha família.

Ao meu filho Henrique. Eu o amo muito e sempre vou amá-lo. Que o amor e a felicidade possam acompanhá-lo sempre, e que os frutos do meu trabalho possam trazer benefício à sua vida.

Aos meus pais, Ângela e Atilio, e ao meu irmão Rafael com quem sempre posso contar, pois sempre estarão ao meu lado me apoiando.

À minha vó Bina, que é um exemplo de amor, de fé e de vida maravilhoso. Admiro sua força e sua coragem.

Ao meu vô Gentil, você é uma inspiração, lembro de você sempre alegre, festivo e com um coração enorme acolhendo toda a família e amigos com um amor incondicional.

À minha vó Jaci, por me ensinar o amor à família, ao café e ao chimarrão.

AGRADECIMENTOS

Obrigado Senhor, por estar ao meu lado nesta caminhada. Por mais que ande pelo vale das sombras da morte, não temerei mal algum, pois o Senhor é meu pastor e nada me faltara.

Ao meu orientador, Edvaldo da Silva Trindade, pelo profissionalismo e competência sempre aliados à sua incrível capacidade de compreensão. Eds, obrigado por tudo que me ensinou, pelo apoio, pelos conselhos e por fazer tudo o que estava ao seu alcance para que este trabalho fosse realizado.

À minha coorientadora, Stellee Marcela Petris Biscaia, por me incentivar, apoiar, e me ajudar nos momentos complicados deste trabalho. Sua ajuda foi muito importante para mim. Obrigado por me guiar nos experimentos e me ensinar.

Ao professor Dr. Rogers Chammas, por abrir as portas de seu laboratório e me dar a oportunidade de conhecer e trabalhar com sua excelente equipe. O ICESP-FMUSP é pra mim um exemplo de sucesso e profissionalismo, que conta com pessoas competentes e atenciosas, sempre pontas a ajudar. Obrigado Cristiane, Lizeth, Renata, Mara, Adalberto e todos os que conheci.

Ao professor Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, por ceder o polissacarídeo utilizado neste trabalho, e por sua dedicação e de sua equipe ao enorme trabalho em coletar a alga, extrair, purificar e nos enviar a Fucana A.

Nada seria possível se não fosse a ajuda incondicional dos meus amigos e colegas dos laboratórios LIPS (Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados) e LCIN (Laboratório de Células Neoplásicas e Inflamatórias). Nestes laboratórios trabalham as pessoas mais incríveis que conheci, ajudando sempre que possível, sempre com vontade, sempre de bom humor, sérios no trabalho, brincalhões e divertidos de conviver. Obrigado Jessica, Açucena, Aline, Daniel, Gustavo, Jenifer, João, Maira, Odair, Stellee, Thiago e Vivi.

Aos Professores do Setor de Biológicas e da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por todo o ensinamento e discussões que me fizeram crescer profissionalmente. Principalmente às professoras Carolina Oliveira e Fernanda Simas, por toda ajuda e dedicação.

Obrigado ao CTAF (Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência), à Lisandra e à Alessandra por “segurarem as pontas” dos atendimentos do laboratório e pela dedicação e ajuda em todos os momentos.

Às secretarias do departamento de Biologia Celular, da Direção do Setor e da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Mirian, Claudinha, Marlene e Lucas.

À Eliane e ao Seu Nino, por tudo que me ensinaram e por toda a ajuda que me deram.

Ao Hospital Veterinário da UFPR, sob a responsabilidade da Prof. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich, e do MSc. Olair Carlos Beltrame. E a prof. Dra. Alexandra Acco, pelo apoio.

Todo homem e toda a mulher é uma estrela.

(Aleister Crowley, AL I:3, 1904)

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele extremamente agressivo e letal após metástases, sendo que a taxa de sobrevivência de 5 anos é estimada entre 15% e 20%, e de 10 anos, entre 10% e 15%, após o diagnóstico tardio. Os atuais tratamentos, como quimioterapia, imunoterapia e/ou terapias direcionadas, produzem severos efeitos adversos, que limitam a reabilitação e reduzem a taxa de sobrevivência dos pacientes. Os polissacarídeos sulfatados representam uma alternativa de tratamento que possui baixos efeitos colaterais melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Estudos anteriores mostraram que a fucana A, um polissacarídeo sulfatado extraído da alga marrom *Spatoglossum schröderi*, não é citotóxica, mas reduziu a capacidade de invasão celular, quando testada *in vitro* em célula de melanoma murino B16F10. No presente trabalho foi avaliada a ação antitumoral *in vivo* da fucana A, em melanoma murino nos modelos de tumores sólidos subcutâneos e de colonização/metástase pulmonar. Em um tratamento terapêutico, que ocorre após o estabelecimento do tumor sólido, a dose de 100mg/kg de fucana A foi capaz de inibir o crescimento tumoral em torno de 50%, bem como reduzir em 83% a área de vasos intratumorais. Em um tratamento preventivo, que ocorre antes do estabelecimento do tumor sólido, a dose de 30mg/kg foi capaz de inibir o crescimento tumoral em mais de 30%. O tratamento preventivo com a fucana A, no modelo de metástase pulmonar, resultou na redução de 66,86% do número de nódulos implantados no pulmão, quando a dose de 30mg/kg do polissacarídeo foi utilizada. A análise dos parâmetros fisiológicos, perfis hematológico e bioquímico, não mostram alterações que indiquem toxicidade, sugerindo que o polissacarídeo é seguro para uso *in vivo*. Portanto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a fucana A possui atividade antimelanoma, reduzindo o crescimento *in vivo* de tumores sólidos e a formação de metástases pulmonares de melanoma murino.

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

ABSTRACT

Melanoma represents a highly aggressive form of skin cancer that can be lethal after metastasis, with an overall 5-year survival of 15% to 20%, and 10-year survival of 10% to 15% in advanced stages. Current treatments, such as chemotherapy, immunotherapy and/or targeted therapy cause significant side effects that have limited treatment efficacy and patient survival rates. Sulphated polysaccharides can be considered as a treatment alternative with low side effects, improving patients' quality of life. Previous studies showed that fucan A, a sulphated polysaccharide extracted from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi*, was not cytotoxic but reduced the cell invasion when tested *in vitro* in murine melanoma cell line B16F10. In the present *in vivo* study, the antitumor potential of fucan A was evaluated in subcutaneous solid tumors and lung metastasis murine melanoma models. In therapeutic treatment, after the establishment of solid tumor, 100mg/kg dose of fucan A inhibited tumor growth by about 50% and reduced 83% the area of intratumoral vessels. In prophylactic treatment, before the establishment of the solid tumor, 30mg/kg dose was able to inhibition of tumor establishment in more than 30%. Prophylactic treatment with fucan A in the pulmonary metastasis model resulted in a 66.86% decrease number of nodules implanted in the lungs, when 30 mg/kg dose was used. Analysis of physiological parameters, hematological and biochemical profiles did not show any significant change related to toxicity, indicating that fucan A is safe for *in vivo* administration. Therefore, the data obtained in the present study suggest that fucan A has antimelanoma activity, reducing solid tumors growth and pulmonary metastases formation in murine model.

Keywords: Melanoma. Sulphated polysaccharide. Fucan A. *Spatoglossum schröderi*.

Antitumoral.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FASES DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.....	21
FIGURA 2 – ORIGEM E PROGRESSÃO DO MELANOMA A PARTIR DE EXPOSIÇÃO SOLAR.....	22
FIGURA 3 – CONTRIBUIÇÕES DAS CÉLULAS DO ESTROMA PARA O DESENVOLVIMENTO TUMORAL.....	24
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FUCANA A.....	32
FIGURA 5 – PREPARO DOS ANIMAIS PARA OS ENSAIOS REALIZADOS.....	36
FIGURA 6 – QUANTIFICAÇÃO MORFOLOGIA DA ÁREA DE VASOS SANGUÍNEOS.....	48
FIGURA 7 – QUANTIFICAÇÃO VEGF NO TECIDO TUMORAL E NO TECIDO ADJACENTE AO TUMOR.....	50
FIGURA 8 – QUANTIFICAÇÃO MORFOLOGIA DA ÁREA DE MORTE.....	51
FIGURA 9 – QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DE KI-67 NO TECIDO TUMORAL	52
FIGURA 10 – FUCANA A LEVA A UMA REDUÇÃO DA QUANTIDADE DE NÓDULOS PULMONARES.....	60
FIGURA 11 – VARIAÇÃO DO TAMANHO DOS NÓDULOS TUMORAIS.....	61
FIGURA 12 – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NÓDULOS TUMORAIS NO TECIDO PULMONAR.....	64

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – A ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DA FUCANA TEMPO E DA DOSE DEPENDENTES.	33
GRÁFICO 2 – EFEITO DO TRATAMENTO COM A DOSE DE 15mg/kg DE FUCANA A SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL.	42
GRÁFICO 3 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM AS DOSES DE 30mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL.....	43
GRÁFICO 4 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM A DOSE DE 100 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL.....	44
GRÁFICO 5 – CURVAS DE CRESCIMENTO TUMORAL E TEMPO DE DOBRAMENTO.	45
GRÁFICO 6 – EFEITO DO TRATAMENTO TERAPÊUTICO COM A DOSE DE 100 mg/kg DE FUCANA A SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS.	46
GRÁFICO 7 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM 100 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL HEMATOLÓGICO.....	47
GRÁFICO 8 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM 100 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO.	47
GRÁFICO 9 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL.....	56
GRÁFICO 10 – CURVAS DE CRESCIMENTO TUMORAL E TEMPO DE DOBRAMENTO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A.....	57
GRÁFICO 11 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS NO MODELO DE TUMOR SÓLIDO	58
GRÁFICO 12 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL HEMATOLÓGICO NO MODELO DE TUMOR SÓLIDO	59
GRÁFICO 13 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO NO MODELO DE TUMOR SÓLIDO	59

GRÁFICO 14 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM 30mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS NO MODELO DE METÁSTASE PULMONAR.....	62
GRÁFICO 15 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM 30mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL HEMATOLÓGICO NO MODELO DE METÁSTASE PULMONAR.....	63
GRÁFICO 16 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM 30mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO NO MODELO DE METÁSTASE PULMONAR.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2012 DO NÚMERO DE NOVOS CASOS E DA TAXA BRUTA DE INCIDÊNCIA DE MELANOMA.	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ALT/TGP	- Alanina aminotransferase/ Transaminase glutâmica pirúvica;
AST/TGO	- Aspartato aminotransferase/ Transaminase glutâmica oxalacética;
Cm ³	- Centímetros cúbicos;
CdK	- do inglês Cyclin-dependent Kinase – Quinase dependente de ciclina;
DIC	- do inglês Differential interference contrast – Contraste de interferência diferencial;
FA	- Fucana A
FGF	- Fator de crescimento de fibroblasto;
g	- Gramas;
ICT	- Inibição do Crescimento Tumoral (Índice);
MMPs	- do inglês matrix metalloproteinases – Metaloproteinases de matriz;
MT-MMP	- do inglês membrane-type MMP - MMP ligada à membrana;
mm ²	- Milímetro quadrado;
mg/kg	- miligramas por quilo;
PBS	- do inglês Phosphate Buffered Saline – Tampão Fosfato salina;
SBF	- Soro bovino fetal;
SD	- do inglês standard deviation - desvio padrão
VEGF	- do inglês Vascular endothelial growth factor - fator de crescimento do endotélio vascular;
VLDL	- do inglês Very Low Density Lipoprotein - lipoproteína de densidade muito baixa;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	16
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo geral	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ORIGEM E PROGRESSÃO DO MELANOMA	19
2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL.....	23
2.2.1 Angiogênese tumoral.....	25
2.2.2 Moléculas chave no desenvolvimento tumoral	26
2.2.2.1 Metaloproteases	26
2.2.2.2 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos	27
2.3 TRATAMENTOS ATUAIS PARA MELANOMA	28
2.3.1 Polissacarídeos sulfatados e ação antitumoral	30
2.3.1.1 Heparina	30
2.3.1.2 Fucoidanas	31
2.3.1.3 Fucana A	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 LINHAGEM CELULAR	34
3.2 POLISSACARÍDEO.....	34
3.3 MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	35
3.3.1 Modelo de tumores sólidos subcutâneos	35
3.3.2 Modelo de colonização experimental ou metástase pulmonar	37
3.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	38
3.5 ANÁLISE MORFOLOGICA DOS TECIDOS.....	38
3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA	39
3.6.1 Análise de imagem das imunofluorescência.	39
3.7 ANÁLISE DOS DADOS.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 FUCANA A COMO POSSÍVEL TRATAMENTO TERAPÊUTICO	41
4.1.1 Determinação da dose para tratamento terapêutico	41

4.1.1.1 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 15mg/kg de fucana A sobre o crescimento tumoral.	41
4.1.1.2 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 30mg/kg de fucana A sobre o crescimento tumoral.	42
4.1.1.3 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 100mg/kg de fucana A sobre o crescimento tumoral.	43
4.1.2 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 100mg/kg de fucana A sobre os parâmetros fisiológicos em camundongos	45
4.1.3 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 100mg/kg de fucana A sobre a morfologia dos tumores	48
4.1.4 Discussão dos resultados do tratamento terapêutico	53
4.2 FUCANA A COMO POSSÍVEL TRATAMENTO PREVENTIVO	55
4.2.1 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre o crescimento tumoral em modelo de tumor sólido	56
4.2.2 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre os parâmetros fisiológicos em camundongos	57
4.2.3 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre o modelo colonização ou metástase pulmonar	60
4.2.4 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre os parâmetros fisiológicos em camundongos no modelo colonização ou metástase pulmonar	61
4.2.5 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre morfologia dos nódulos pulmonares.....	64
4.2.6 Discussão dos resultados dos tratamentos preventivos com fucana A	64
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO 1 – CERIFICADO CEUA-UFPR	76
ANEXO 2 – CERIFICADO CEUA-FMUSP	77

1 INTRODUÇÃO

Entre os tipos de câncer de pele o melanoma é o que apresenta a menor incidência, contudo, quando apresenta metástases, esse tipo de câncer torna-se quase incurável, sendo a taxa de sobrevivência de 5 anos estimada entre 15% e 20% e, a de 10 anos, entre 10% e 15%, após o diagnóstico (ACS, 2015). No Brasil estima-se, para o biênio 2018-2019, a ocorrência de cerca de 6.260 novos casos de melanoma para cada ano, sendo 2.920 em homens e 3.340 em mulheres (INCA, 2017).

O tipo de tratamento indicado para pacientes com melanoma inicia-se a partir da remoção cirúrgica da lesão primária que, ao ser avaliada histologicamente, conduz o tratamento para quimioterapia, imunoterapia e/ou terapias direcionadas (HARRIES *et al.*, 2016). Estes tratamentos produzem severos efeitos adversos, que limitam a reabilitação e reduzem a taxa de sobrevida dos pacientes (JIANG, *et al.*, 2014).

Desta forma, a busca por novos agentes terapêuticos, que aumentem a sobrevida e melhorem a qualidade de vida dos pacientes e, por outro lado, que apresentem baixos efeitos colaterais, é de extrema importância. Os polissacarídeos sulfatados como fucoidanas e fucanas tem despertado o interesse por suas propriedades bioativas no combate ao câncer. Esses compostos podem ser obtidos de fontes renováveis, como as algas marrons, e possuem baixo ou nenhum efeito colateral (ROCHA, COSTA e LEITE, 2011).

1.1 JUSTIFICATIVA

O melanoma é um tipo de câncer com baixa incidência, mas com altas taxas de mortalidade, devido a sua pouca responsividade aos tratamentos clínicos atuais. De modo que, a busca por novos agentes terapêuticos que além de aumentarem a sobrevida, melhorem a qualidade de vida dos pacientes e apresentem baixos efeitos colaterais, é de significativa importância.

Testes *in vitro* utilizando a fucana A mostraram resultados promissores, como a redução da capacidade de invasão e da expressão de MMPs, sugerindo um possível efeito antitumoral sem apresentar citotoxicidade (FERREIRA, 2012; SANTI, 2015). Assim, faz-se necessário avaliar se esse composto é eficaz em modelo *in vivo*, tendo em vista sua complexidade metabólica e respostas sistêmicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a ação antitumoral *in vivo* da fucana A, em modelo de melanoma murino.

1.2.2 Objetivos específicos

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

- 1) Analisar a dose terapêutica de fucana A, que mostre ação antitumoral em modelo de tumor sólido subcutâneo;
- 2) Observar se a utilização da fucana A produz alterações nos parâmetros fisiológicos, o que indica possíveis efeitos adversos;
- 3) Analisar os efeitos do tratamento sobre o tecido tumoral, em especial sobre o comportamento de proliferação, angiogênese e sobrevivência/morte celular;
- 4) Avaliar se a fucana A apresenta ação preventiva, sobre o crescimento tumoral em modelo de tumor sólido subcutâneo;
- 5) Avaliar se a fucana A apresenta ação preventiva, sobre a implantação de nódulos pulmonares em modelo de colonização ou metástase pulmonar;

2 REVISÃO DE LITERATURA

Segundo dados apresentados em 2017 pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), órgão ligado ao Ministério da Saúde, o câncer de pele configura-se como o câncer mais frequente em todas as populações. Ele se apresenta basicamente sob duas formas: o melanoma e o não melanoma.

O melanoma é um tipo de câncer de pele, originado a partir de melanócitos (células da pele responsáveis pela produção da melanina) que apresentam alterações do controle do ciclo celular, o que leva a proliferação desordenada das células. Diferentemente daqueles cânceres que são originados de queratinócitos, o câncer de pele tipo melanoma não é o mais comum entre eles, pois corresponde a apenas 3,1% do total dos cânceres de pele, mas é o mais agressivo. Se diagnosticado nos estágios iniciais pode ser removido cirurgicamente com alta possibilidade de cura (INCA, 2015; ACS, 2015). Entretanto, quando apresenta metástases, esse tipo de câncer torna-se quase incurável, sendo que a taxa de sobrevivência de 5 anos é estimada entre 15% e 20%, e de 10 anos, entre 10% e 15%, após o diagnóstico (ACS, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION) estima que ocorrem mais de 130 mil novos casos por ano de melanoma, no mundo (WHO, 2016). Entretanto, de acordo com os dados divulgados pelo projeto GLOBOCAN 2012, realizado pela International Agency for Research on Cancer (IARC), que é um órgão ligado à própria WHO, estimou-se que para o ano de 2012 seriam mais de 232.000 casos, como pode ser observado na Tabela 1 (IARC, 2012).

TABELA 1 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2012 DO NÚMERO DE NOVOS CASOS E DA TAXA BRUTA DE INCIDÊNCIA DE MELANOMA.

POPULAÇÃO	NOVOS CASOS	TAXA BRUTA *
MUNDIAL	232.130	3,3
EUROPA - WHO	104.192	11,5
AMÉRICAS – WHO	88.546	9,3
- ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA	69.109	21,9
- BRASIL	6.172	3,1
OESTE DO PACÍFICO - WHO	27.772	1,5
- AUSTRÁLIA / NOVA ZELÂNDIA	14.738	53,8
ÁFRICA - WHO	6.082	0,7
SUL E LESTE DA ÁSIA - WHO	4.012	0,2
LESTE MEDITERRÂNEO - WHO	1.815	0,3

FONTE: IARC, 2012; Projeto GLOBOCAN 2012. * A taxa bruta é calculada por 100.000 habitantes.

Os números apresentados na Tabela 1 mostram que a maior taxa de incidência de melanoma ocorre na Austrália e Nova Zelândia, onde atingem mais de 53 casos por 100.000 habitantes por ano. Nos Estados Unidos (EUA) a taxa de incidência atinge mais de 21 casos por 100.000 habitantes por ano e no Brasil essa taxa atinge aproximadamente 3 casos por 100.000 habitantes por ano (IARC, 2012).

Informações mais recentes do Australian Institute of Health and Welfare (AIHW), órgão ligado ao governo Australiano, estimaram para 2018 a ocorrência de aproximadamente 14.000 novos casos de melanoma, sendo 8.392 casos em homens e 5.549 casos em mulheres (AIHW, 2017). Já para os EUA, para o ano de 2016, estimou-se mais de 76.000 novos casos de melanoma, sendo 46.870 casos em homens e 29.510 casos em mulheres (ACS, 2016; SIEGEL, MILLER e JEMAL, 2016).

No Brasil, dados divulgados pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), órgão ligado ao Ministério da Saúde, mostra-se que ocorreram 1.547 mortes decorrentes do melanoma no ano de 2013, sendo 903 homens e 644 mulheres; e estima-se para o biênio 2018-2019, que ocorram cerca de 6.260 novos casos para cada ano, sendo 2.920 em homens e 3.340 em mulheres (INCA, 2017).

2.1 ORIGEM E PROGRESSÃO DO MELANOMA

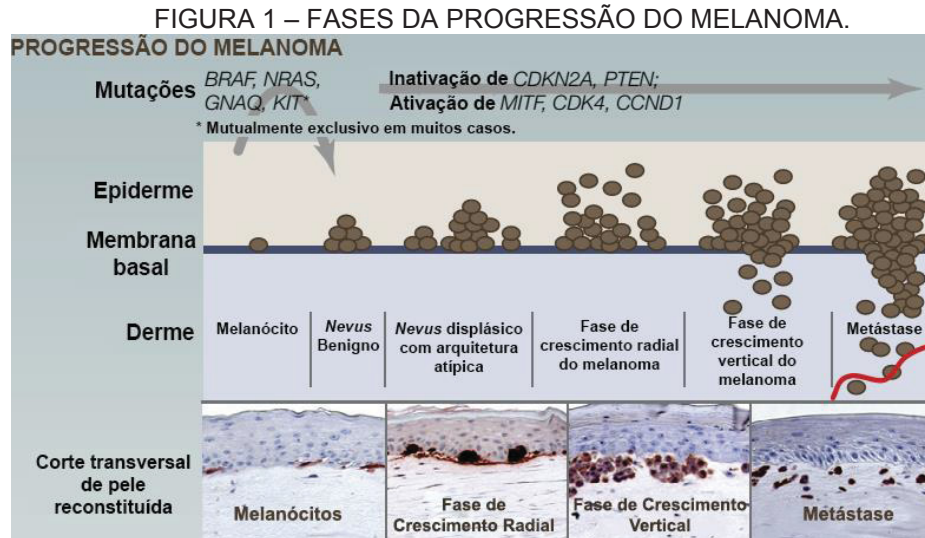
Os fatores de risco associados ao surgimento do melanoma são: a cor da pele, a exposição excessiva ao sol, o histórico familiar, a predisposição genética e a presença de *nevi* melanocíticos (pintas escuras) (HOUGHTON e POLSKY, 2002).

Chang e colaboradores (2009) relacionam como fatores de risco associados ao surgimento do melanoma induzidos por exposição solar, o tipo de atividade realizada durante exposição e a latitude em que a pessoa se encontra. A exposição ao sol em atividades recreativas ao ar livre, com o uso de trajes de banho e banhos de sol, são fatores que elevam a probabilidade de ocorrência de melanoma no tronco e nos membros. Já as exposições durante as atividades laborativas elevam a probabilidade do surgimento de melanoma na cabeça e pescoço. Adicionalmente, em regiões próximas à linha do equador (em baixas latitudes) os efeitos da exposição solar são mais evidentemente nocivos, em relação aos relatados em altas latitudes (CHANG et al., 2009).

A radiação solar UV produz danos ao DNA, levando a um aumento na taxa de mutações que cumulativamente levam a formação de tumores. A exposição ao sol induz a um aumento na quantidade de *nevi* melanocíticos; e o número, o tamanho, a forma, a simetria e a coloração destes *nevi*, estão associados a fatores de risco adicionais e ao diagnóstico clínico de melanoma (SCHADENDORF et al., 2015; INCA – 2015).

Clark e colaboradores (1984) estudaram a progressão do melanoma a partir de *nevi* melanocíticos e estabeleceram 6 etapas principais da transformação maligna do tumor. Estas fases são: 1) aquisição de nevus melanocítico comum; 2) nevus melanocítico com hiperplasia lentiginosa, ou seja, diferenciação aberrante; 3) nevus melanocítico com a diferenciação aberrante e displasia melanocítica; 4) fase de crescimento radial do melanoma primário (conhecida como RGP – Radial Growth Phase); 5) fase de crescimento vertical do melanoma primário (conhecida como VGP – Vertical Growth Phase); e 6) melanoma metastático.

No primeiro estágio o nevus comum é considerado uma lesão benigna. Nos estágios 2 e 3 o nevus passa a apresentar diferenciações que caracterizam alterações importantes na atividade celular, como hiperplasia e displasia. Nos estágios 4 (RGP) e 5 (VGP) o nevus passa a ser considerado melanoma primário, sem capacidade metastática para a fase RGP e com capacidade metastática para a fase VGP. No estágio 6 as lesões já apresentam características metastáticas com melanócitos bastante pigmentados, grandes, atípicos e distribuídos por toda a camada epidérmica, estendendo-se para o interior da camada dérmica e próximo a vasos sanguíneos (CLARK et al., 1984). A Figura 1 ilustra o processo de progressão tumoral e relaciona as mutações mais comumente observadas para originar o tumor, bem como aquelas subsequentes que levam à transformação maligna do tumor (VULTUR e HERLYN, 2013).



FORNTE: Adaptado de VULTUR e HERLYN, 2013.

LEGENDA: A Figura acima ilustra, de forma esquemática, a secção vertical da pele e as micrografias da pele, mostrando a progressão do melanoma. Para tanto, melanócitos normais presentes na junção epidérmica sofrem mutações iniciais em *BRAF* ou *NRAS* ou em outros genes de iniciação tumoral formando nevus benigno ou comum. Ao adquirir novas mutações progridem formando nevus displásico, com proliferação atípica. A progressão continua com o crescimento radial do melanoma (fase RGP), seguida pelo crescimento vertical (fase VGP). As alterações podem levar à formação de melanoma metastático com a invasão da derme, e conseqüentemente à metástase.

O desenvolvimento do câncer de pele do tipo melanoma é um processo complexo que envolve o início e a progressão do tumor, sendo diretamente relacionada à aquisição progressiva de alterações genéticas. Danos sucessivos ao DNA levam a mutações em vias de sinalização, como as MAP-Kinases (*Ras*, *Raf*, *MEK* e *ERK*), *PI3K/AKT*, bem como em reguladores chaves do ciclo celular, como *p53*, *p21*, *p16 (INK4A)*, ciclina *D1*, proteína retinoblastoma (*pRB*), além de muitos outros fatores. O acúmulo de mutações leva a diferenciação celular e ao crescimento descontrolado, que resultam, após anos de exposição aos fatores de risco, ao surgimento de câncer de pele, dentre os quais encontra-se o melanoma. (BANDARCHI et al., 2013; SCHADENDORF et al., 2015; SEEBODE, LEHMANN e EMMERT, 2016)

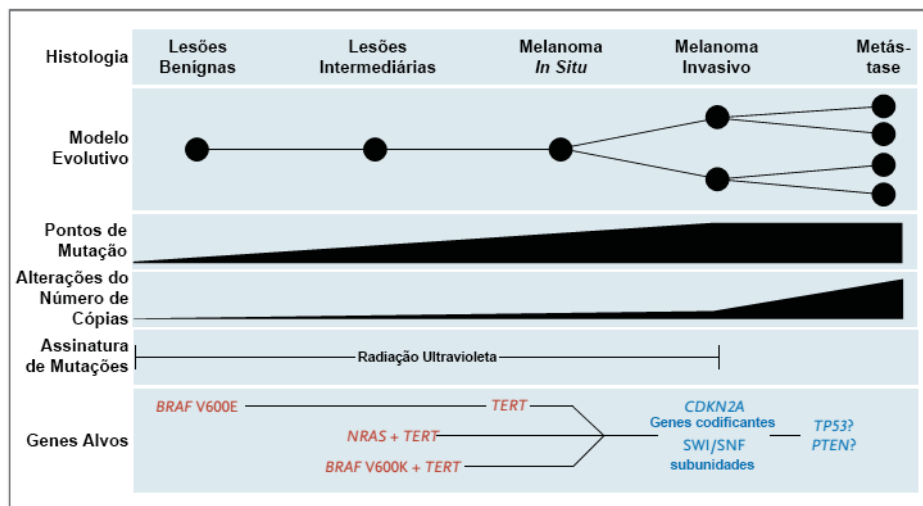
A mutação mais comumente encontrada em melanomas é aquela que ocorre no gene *Braf* com substituição do códon que codifica um ácido glutâmico na posição 600 para o códon de uma valina, sendo então a proteína resultante denominada *BRAFV600E*. A proteína *BRAF* integra a via de sinalização MAP-kinase, e está envolvida com ciclo celular. Esta mutação gera a ativação constitutiva dessa via, o que contribui para o aumento da proliferação de melanócitos e, conseqüentemente ao surgimento de tumores benignos iniciais, ou nevus benigno (SHAIN et al., 2015;

ELDER, 2016). Hodis e colaboradores (2012) demonstraram que a mutação da BRAF ocorre em mais de 60% dos melanomas, e Shain e colaboradores (2015) ao avaliarem nevi benignos próximos a melanomas, encontraram como única mutação a BRAF^{V600E}.

Entretanto somente a mutação da BRAF não é suficiente para produzir um melanoma. Durante a progressão de nevus benigno para nevus intermediário (hiperplásico e/ou displásico) mutações adicionais ocorrem, como: a) em NRAS que também pertence à via de sinalização MAP-kinase; b) no gene que codifica a telomerase (TERT), impedindo que as células entrem em senescência; c) no gene CDKN2A, que codifica proteínas supressoras tumorais – p16INK4A e p14ARF – envolvidas na regulação do ciclo celular, além de uma grande variação de outras mutações possíveis (BISHOP et al., 2002; SHAIN et al., 2015).

Como podemos observar na Figura 2, o surgimento de mutações relevantes, originadas pela radiação UV, é a base para o início tumoral na forma de uma lesão benigna. O acúmulo de mutações adicionais é fundamental para a progressão tumoral bem como para sua transformação maligna que dá origem a metástases (SHAIN et al., 2015).

FIGURA 2 – ORIGEM E PROGRESSÃO DO MELANOMA A PARTIR DE EXPOSIÇÃO SOLAR.



FONTE: Adaptado de Shain e colaboradores (2015)

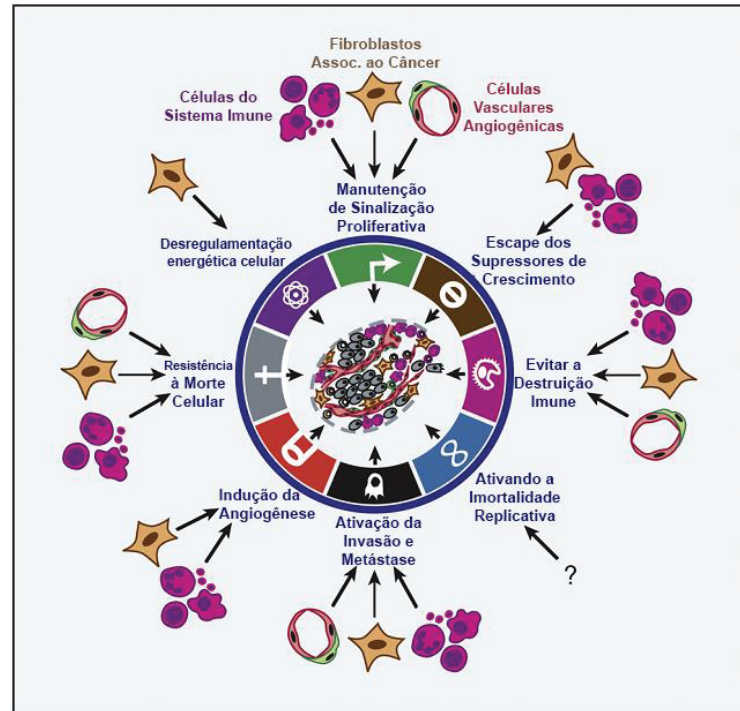
LEGENDA: O Modelo proposto mostra que a radiação ultravioleta (UV) promove a mutação de diversos genes chaves (*drivers genes*) envolvidos com a origem e progressão tumoral, ainda, que o acúmulo destas mutações leva à transformação maligna do tumor e à metástase.

2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

Como discutido anteriormente, as alterações genéticas são de extrema importância para a origem do tumor, e o acúmulo de mutações formam a base das transformações que levam ao fenótipo metastático. Entretanto, sobrevivência, nutrição, proliferação tumoral bem como a capacidade tumorigênica de uma célula tumoral e a sua progressão em malignidade, dependem muito de sua relação com o ambiente extracelular, ou o estroma que o cerca. Este ambiente, chamado de microambiente tumoral (TME – do inglês Tumor Microenvironment), é formado pela interação entre as próprias células tumorais, mas também com fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, células do sistema imune, bem como com a matriz extracelular e os diversos tipos de moléculas presentes no meio (BRANDNER e HAASS, 2013).

As células do estroma são ativadas, ou recrutadas, para atuarem de forma colaborativa com as células do melanoma e desempenham um papel fundamental para a metástase. Estas células podem ser classificadas em três tipos principais: células vasculares angiogênicas, células do sistema imune e fibroblastos associados ao câncer (também conhecidas como CAFs, do inglês Cancer-Associated Fibroblasts). Os três tipos celulares citados, bem como suas contribuições para a progressão tumoral, estão ilustrados na Figura 3 (HANAHAN e COUSSENS, 2012).

FIGURA 3 – CONTRIBUIÇÕES DAS CÉLULAS DO ESTROMA PARA O DESENVOLVIMENTO TUMORAL.



FONTE: Adaptado de HANAHAN e COUSSENS, 2012.

LEGENDA: A Figura acima ilustra, de forma esquemática, três classes principais de células que são recrutadas e que desempenham diversas funções para promoverem o desenvolvimento tumoral e possibilitarem sobrevivência, progressão e metástase das células tumorais.

Nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral, no *nevus* benigno, hiperplásico, displásico e na fase RGP, os melanócitos encontram-se restritos nas camadas da epiderme (CLARK et al., 1984; ELDER, 2016). Nessas etapas possuem fortes interações célula-célula com queratinócitos, principalmente por apresentarem moléculas de adesão como a E-caderina. Nos estágios subsequentes VGP e metástase, ocorrem um aumento da capacidade proliferativa dos melanócitos, invasão da derme e interações com as células do estroma. O aumento da proliferação celular pode ser identificado por uma maior expressão de Ki-67, proteína importante para proliferação celular e utilizada na avaliação do prognóstico de câncer, como no melanoma, câncer de mama, tumores de tecidos moles, câncer de pulmão e outros (BROWN e CARTER, 2002; GIMOTTY, VAN BELLE e ELDER, 2005 e ELDER, 2016). Outra modificação que ocorre nos melanócitos em processo tumoral é a perda da expressão de E-caderina, deixando dessa forma de interagir e de se comunicar com os queratinócitos, e passam a expressar N-caderina, o que as permitem interagir com as células da derme, em especial os fibroblastos (HSU, *et. al.*, 2000a; HAASS, *et. al.*,

2005). Hsu e colaboradores (2000b) demonstraram que se a expressão de E-caderina pode ser reestabelecida em células de melanoma, estas deixam de expressar N-caderina e voltam a interagir com os queratinócitos, além de diminuir as taxas de crescimento tumoral, invasividade e motilidade.

Após a interação do melanoma com os fibroblastos do estroma, formando os CAFs, estes passam a desempenhar um papel essencial no crescimento e progressão do tumor, produzindo uma série de moléculas de matriz extracelular, fatores de crescimento e de sobrevivência, bem como fatores angiogênicos. Os CAFs, em conjunto com o melanoma, modificam a matriz extracelular do estroma e/ou a lâmina basal adjacente ao tumor, aumentando a invasividade das células tumorais e possibilitando a metástase (FRANCO *et al.*, 2010; XING, SAIDOU e WATABE, 2010).

2.2.1 Angiogênese tumoral

As transformações no metabolismo celular dos melanócitos, promovidos pelo acúmulo de mutações, e a intensa proliferação celular aumentam o consumo de nutrientes e o oxigênio no tumor. Assim, as demandas metabólicas em certas áreas do tumor excedem a capacidade de distribuição dos vasos próximos, o que leva à hipóxia, o que se acredita ser o estímulo inicial para a angiogênese. As células do sistema imune e as CAFs desempenham um papel crucial durante a angiogênese tumoral, passando a produzir fatores de crescimento, fatores pró-inflamatórios, quimiocinas, citocinas e outras moléculas, que iniciam o processo de formação de novos vasos sanguíneos que irão nutrir o tumor (XING, SAIDOU e WATABE, 2010; JOUR, IVAN e AUNG, 2016).

Uma grande variedade de moléculas participa da angiogênese, como: a) as das famílias de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF); b) fatores de crescimento de fibroblastos (FGF); c) fator de crescimento transformante alfa e beta (TGF-alfa e TGF-beta); d) fator de crescimento epidermal (EGF); e) fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); f) fator de necrose tumoral alfa (TNF-Alfa); além da angiogenina, interleucina (IL)-8, angiopietinas e outras. Estes diferentes fatores podem tanto ser produzidos pelo próprio melanoma como por células do estroma associadas a ele, ou estão armazenados na matriz extracelular (FERRARA, GERBER e LeCOUTER, 2003; PRESTA, *et al.*, 2005).

O fator de crescimento VEGF e seus receptores tirosina quinases (RTKs), VEGFR-1 e VEGFR-2, são as principais moléculas envolvidas na angiogênese tumoral, atuando principalmente no crescimento e migração das células endoteliais vasculares (ECs) presentes em artérias, veias e vasos linfáticos. O VEGF é uma família de glicoproteínas homodiméricas ligantes de heparina e, dependendo da isoforma produzida pela célula, pode ser encontrada ligada à superfície celular, sequestrada por moléculas da matriz extracelular ou solúvel (FERRARA, GERBER e LeCOUTER, 2003).

2.2.2 Moléculas chave no desenvolvimento tumoral

2.2.2.1 Metaloproteases

As metaloproteases (MMPs) constituem uma família de enzimas dependentes de zinco que degradam diferentes componentes da matriz extracelular. Após serem produzidas, podem ser secretadas, como a MMP-2 e a MMP-9, ou permanecerem ancoradas à membrana celular (MT-MMPs), como a MT1-MMP. Muitas MMPs são produzidas em uma forma latente que contém um pró-domínio inativador (pró-MMPs). A conversão em uma enzima ativa ocorre com a remoção deste pró-domínio (DYE *et al.*, 2013; HOFMANN *et al.*, 2005).

A atividade das MMPs é regulada pelo equilíbrio entre a concentração de enzima e a concentração de moléculas inibidoras chamadas TIMPs (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*). São conhecidas quatro TIMPs (TIMP-1 a TIMP-4) que podem ligar-se tanto a pró-MMPs como a MMPs ativas, solúveis ou de membrana, inibindo desta forma a ativação das enzimas bem como a atividade proteolítica de enzimas ativas (HOFMANN *et al.*, 2005).

A ação da TIMP-2 é controversa, pois dependendo de sua concentração ela pode atuar como inibidor ou como ativador da MMP-2. Em baixas concentrações a TIMP-2 liga-se à MT1-MMP, e então a pró-MMP-2 liga-se à TIMP-2, formando um complexo proteico. Uma MT1-MMP livre interage com o complexo, clivando a pró-MMP-2, convertendo-a em MMP-2 ativa. Entretanto, em altas concentrações da TIMP-2, a ativação da MMP-2 é inibida, pois as MT1-MMPs livres ligam-se à molécula inibidora, impedindo sua interação com o complexo MT1-MMP/TIMP-2/pró-MMP2 formado (DYE *et al.*, 2013).

Nas fases invasivas do melanoma (VGP e metástase) as elevadas concentrações de MMPs ativas promovem degradação e remodelamento da matriz extracelular contribuindo para a angiogênese, aumentando a capacidade invasiva e levando à metástase. Entre as MMPs expressas no melanoma, destacam-se as gelatinases, MMP-2 e MMP-9, que possuem sítios de ligação para os colágenos tipo I, III, IV, V, VII, X e fibronectina. A expressão de MMP-2 por melanomas está relacionada a um prognóstico ruim e à transformação maligna do tumor (BAUVOIS, 2012). Além das MMPs solúveis, a metaloprotease de membrana MT1-MMP também é superexpressa em melanomas, contribuindo para aumentar a capacidade de migração e de invasão celular, desempenhando um papel importante durante a metástase (SHAVERDASHVILI *et al.*, 2014).

A degradação da matriz extracelular facilita a migração tanto de células tumorais na invasão e metástase, como de células endoteliais que formarão novos vasos na angiogênese tumoral. Ainda, durante a angiogênese, a degradação de componentes da matriz pode levar a liberação de fatores de crescimento, como o VEGF e o FGF, estimulando a formação de novos vasos que irão nutrir o tumor (JOUR, IVAN e AUNG, 2016; ZBYTEK, 2008).

2.2.2.2 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos lineares, carregados negativamente, compostos por unidades repetitivas de dissacarídeos, que podem ou não apresentar sulfatação (GANDHI e MANCERA, 2008). As unidades repetitivas são compostas de um ácido hexurônico (D-glucorônico ou L-idurônico) ou um açúcar não aminado, unido por uma ligação glicosídica a um açúcar aminado (hexosamina) (PRYDZ, 2015).

Todos os GAGs, com exceção do ácido hialurônico, são sintetizados unidos a um núcleo proteico através de uma ligação O-glicosídica em um resíduo de serina, formando um proteoglicano. Os diferentes GAGs que formam os proteoglicanos podem ser: condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato, heparam sulfato e heparina (GANDHI e MANCERA, 2008; PINHO e REIS, 2015).

O ácido hialurônico (AH) ou hialuronam é um GAG não sulfatado e sintetizado como uma cadeia de açúcar livre (PINHO e REIS, 2015) de alto peso molecular

(HMW-HA), sendo uma das principais moléculas presentes na matriz extracelular. Sua síntese ocorre na superfície de uma grande variedade de células, incluindo as células do estroma e queratinócitos. HMW-HA pode ser clivada em fragmentos de baixo peso molecular por hialuronidasas. Estes fragmentos estão envolvidos em diversos processos biológicos como indução da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias, angiogênese e aumento da expressão de MMPs em tumores (VOELCKER *et al.*, 2008).

Entre os proteoglicanos destacam-se os de heparan sulfato (PGHSs) que podem estar presentes tanto na superfície das células (sindecans e glicans) como na matriz extracelular (perlecan, agrin e colágeno XVIII). Os PGHSs estão envolvidos na modulação de diversos processos biológicos, como proliferação, diferenciação celular e angiogênese, pois possuem afinidade por diversos ligantes, como por exemplo, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, componentes da matriz, enzimas e inibidores (O'CONNELL e WEERARATNA, 2011; PINHO e REIS, 2015).

Vários tipos de câncer possuem alterações na expressão de PGHS, promovendo a regulação de algumas propriedades das células tumorais tais como o crescimento, migração e adesão celular (Afratis *et al.*, 2016). Um exemplo desta regulação é a atividade pró-angiogênica do perlecan. O domínio V em sua região C-terminal liga-se a receptores de integrina, permitindo que suas cadeias de heparan sulfato (HS) possam interagir diretamente com o VEGFR-2 atuando como um correceptor para VEGF, aumentando a apresentação deste fator de proliferação ao seu receptor (IOZZO e SANDERSON, 2011).

2.3 TRATAMENTOS ATUAIS PARA MELANOMA

O tipo de tratamento indicado para pacientes com melanoma depende do diagnóstico correto para estabelecer o estágio de desenvolvimento do tumor. Geralmente, um protocolo de tratamento se inicia com a remoção cirúrgica da lesão primária. A partir da análise histológica é estabelecido, como maior exatidão, o estágio de desenvolvimento tumoral, bem como sua capacidade de gerar metástases. Em *nevi* iniciais e não metastáticos, a remoção cirúrgica é a cura (WAGNER *et al.*, 2000). No entanto, em estágios avançados (VGPs e metastáticos) exige-se uma combinação de tratamentos que inicia com a remoção cirúrgica do tumor primário (se for possível

detectá-lo), seguida de dissecação de linfonodos em busca de metástases. Pacientes com metástases disseminadas podem ser tratados por quimioterapia, imunoterapia e/ou terapia direcionada (HARRIES *et al.*, 2016).

Atualmente existem diversos quimioterápicos em uso para tratamento de melanoma, destacando-se os agentes citotóxicos como Dacarbazina, Temozolomida e Fotemustina (HARRIES *et al.*, 2016). Entretanto, o mais conhecido é a Dacarbazina, que é utilizada desde 1975. Esta droga é citotóxica para células em divisão celular, promovendo dano ao DNA, o que resulta em morte celular. Entretanto, apenas 10% a 20% dos pacientes respondem ao tratamento e apresentam sobrevida média de 8 meses (MATOS e FRANCISCO, 2013). A toxicidade da Dacarbazina produz severos efeitos adversos, sendo os mais comuns, fadiga, náuseas, vômito e neutropenia, isto é, redução do número de neutrófilos circulantes (CHAPMAN *et al.*, 2011).

Dentre os imunoterápicos utilizados para o melanoma, encontram-se o Interferon alpha-2b, a Interleucina-2 (IL-2), o Ipilimumab (anticorpo anti-CTLA-4), e os anticorpos anti-PD1 (Pembrolizumab e Nivolumab). Desses, destaca-se o uso do Ipilimumab, um anticorpo monoclonal (IgG1), que atua como inibidor do receptor de CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) na superfície de linfócitos T citotóxicos. O CTLA-4, quando estimulado, promove a inibição da função do linfócito T, desta forma o seu bloqueio potencializa a resposta antitumoral deste tipo celular (HODI *et al.*, 2010; BOWYER *et al.*, 2016). Eventos adversos do Ipilimumab ocorrem em aproximadamente 50% a 60% dos pacientes, dos quais 10% a 15% apresentaram efeitos colaterais mais severos. Os efeitos mais comumente encontrados foram erupções cutâneas, prurido, diarreia, colite, fadiga, hepatite e endocrinopatias (HODI *et al.*, 2010).

O Vemurafenib é um dos principais representantes da terapia direcionada. Trata-se de um potente inibidor específico da mutação BRAF^{V600E} (presente em aproximadamente 60% dos melanomas) e não afeta células com o gene BRAF não mutado (*wild-type*) (CHAPMAN *et al.*, 2011). O Vemurafenib foi associado com uma redução relativa de 63% no risco de morte em comparação com Dacarbazina (CHAPMAN *et al.*, 2011), tendo sobrevida média de mais de 15 meses (SOSMAN *et al.*, 2012). Os efeitos adversos comumente relatados são artralgia, erupção cutânea, fotossensibilidade, fadiga, alopecia, náuseas e diarreia. Além disso, entre 18% e 26% dos pacientes pode apresentar um tipo de neoplasia secundária decorrente do

tratamento, o carcinoma espinocelular ou epidermóide (CHAPMAN *et al.*, 2011; SOSMAN *et al.*, 2012).

2.3.1 Polissacarídeos sulfatados e ação antitumoral

2.3.1.1 Heparina

A heparina é um polissacarídeo altamente sulfatado, da família dos glicosaminoglicanos. Farmacologicamente é utilizada com agente anticoagulante e antitrombótico, desde a década de 1950 (WARDROP E KEELING, 2008). Seu uso clínico no tratamento de pacientes com câncer está relacionado com a prevenção e tratamento da Síndrome de Trousseau, que consistem em eventos de trombose associados ao câncer (IKUSHIMA *et al.*, 2016). Pacientes que receberam heparina ou sua forma fracionada (heparina de baixo peso molecular – LMHW) apresentaram aumento do tempo médio de sobrevivência, sugerindo um efeito antitumoral. O efeito antimetastático está relacionado com a interação da heparina com moléculas de P-selectinas, presentes na superfície das células tumorais. Esta interação diminui a adesão celular dificultando o processo de rolagem que antecede a diapedese e, conseqüentemente, impedindo a invasão de novos tecidos (MARAVEYAS *et al.*, 2010).

Além disso, a heparina também possui efeito inibidor sobre a angiogênese e sobre a proliferação das células tumorais, cujo efeito está relacionado com a interação da heparina com as moléculas que possuem sítio característico para sua interação (*heparin-binding*). Dentre estas moléculas destacam-se fatores de crescimento e angiogênicos, como o VEGF e o FGF-2, cuja função pode ser inibida pela ligação com a heparina. Além disso, outro efeito decorrente de seu uso é a redução da expressão de proteases, como as MMPs e heparanases, o que também contribui para a redução do potencial metastático do tumor (NIKITOVIC *et al.*, 2014).

Segundo Bobek e colaboradores (2005), a heparina promove a ativação do sistema imune, aumentando a atividade citotóxica das células *natural killers* (NK), o que pode contribuir para a atividade antimetastática atribuída à heparina.

2.3.1.2 Fucoïdanas

As fucoïdanas podem ser definidas como uma classe de polissacarídeos ricos em fucose, apresentando diferentes graus de sulfatação, e encontrados principalmente na parede celular de algas marrons e em alguns equinodermatas (ROCHA, COSTA e LEITE, 2011; FITTON, STRINGER E KARPINIEC, 2015).

As fucoïdanas podem ser utilizadas como adjuvante aos quimioterápicos aumentando a eficiência dessas drogas (BURNEY, *et al.*, 2017).

A fucoïdana bruta possui uma ação pró-apoptótica em células 4T1, de câncer de mama em camundongos, por diminuir a expressão de bcl-2, levando a liberação de citocromo C para o citoplasma e consequente ativação de Caspase 3. Além disso, possui ação antiangiogênica no microambiente tumoral promovendo a redução da expressão de VEGF (XUE, *et al.*, 2012).

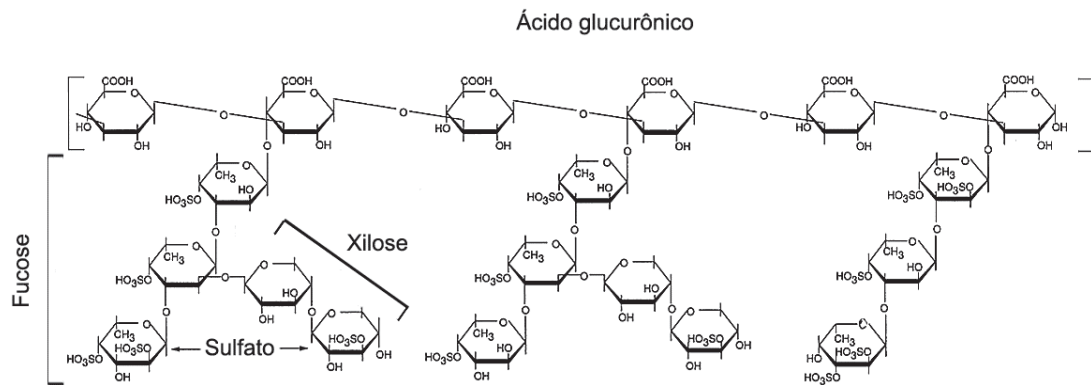
2.3.1.3 Fucana A

Na busca por novos compostos com ação antitumoral há um grande interesse por compostos com atividade antitrombótica, sendo consideradas moléculas similares a heparina (ou *heparin-likes*), dentre as quais destacam-se as fucanas (FERREIRA, 2012; SANTI, 2015).

As fucanas são definidas como uma família de polissacarídeos sulfatados contendo grande quantidade de L-fucose, e podem ser obtidas de fontes vegetais, como a alga marrom *Spatoglossum schroederi* (ROCHA *et al.*, 2001). Quando apresentam mais de um tipo de monossacarídeo em sua composição, estas moléculas podem ser denominadas heteropolissacarídeos ou heterofucanas (ROCHA, COSTA e LEITE, 2011).

A fucana A é um dos três polissacarídeos ricos em fucose, extraídos de *S. schroederi*, e corresponde a 20% do total de polissacarídeos ácidos presente na alga. É uma heterofucana de 21KDa (Figura 4), composta por um núcleo oligossacarídico de 4,5 KDa, formado de ácidos glucurônicos β (1 - 3) ligados, com ramificações em C4 de cadeias de fucose α (1 - 3) ligadas. A fucose é, em grande parte, substituída em C4 por um grupo sulfato e em C2 com cadeias de xilose β (1 - 4), que, por sua vez também é parcialmente sulfatada (LEITE *et al.*, 1998; BARROSO *et al.*, 2008).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FUCANA A



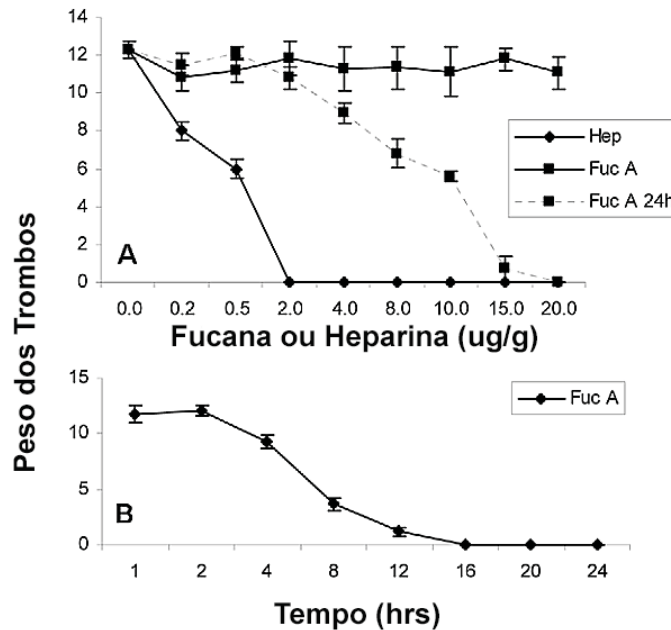
FONTE: Adaptado de LEITE et al., 1998.

LEGENDA: A Figura acima ilustra, de forma esquemática, a estrutura química proposta por Leite e colaboradores (1998), para a fucana A extraída da alga *Spatoglossum schröderi* (Dictyotaceae).

Alguns efeitos biológicos desta fucana já foram descritos. Leite e colaboradores (1998) relatam que a fucana A é capaz de induzir a produção de proteoglicanos de heparan sulfato (PGHS) por células endoteliais de aorta de coelho.

Barroso e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antitrombótica da fucana A e apresentam uma curva de dose/resposta (Gráfico 1), em que as doses de 15 mg/kg e 20 mg/kg de fucana reduzem a formação de trombos em ratos, se administradas 24h antes da ligadura da veia cava. Esta atividade é tempo dependente e ocorre somente quando a fucana é administrada pelo menos 16h antes da produção de trombos. Barroso e colaboradores (2008) atribuem esta atividade à capacidade da fucana A em induzir a produção de PGHS por células endoteliais, como relatado por Leite e colaboradores (1998).

GRÁFICO 1 – A ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DA FUCANA TEMPO E DA DOSE DEPENDENTES.



FONTE: Adaptado de BARROSO *et al.*, 2008.

LEGENDA: Gráfico que compara a atividade antitrombótica entre a fucana A e a Heparina, e mostra sua ação dependente de dose. B – O gráfico mostra que a atividade antitrombótica da fucana A é tempo dependente.

Nos estudos realizados anteriores, em nosso grupo de pesquisa, Ferreira (2012) e Santi (2015), utilizando as fucanas A e C, obtidas da alga *Spatoglossum schröderi*, constataram que essas moléculas não se mostraram citotóxicas e nem alteraram a viabilidade das células de melanoma murino em cultura (linhagem B16F10). No entanto, foram capazes de reduzir o potencial de invasão dessas células (SANTI, 2015). Essa característica decorreu da diminuição da expressão de MMPs e, conseqüentemente, de sua atividade gelatinolítica, bem como de expressão de outras moléculas chaves no processo tumoral, como os proteoglicanos, e de enzimas que participam do seu remodelamento, como as sulfatases e heparanases (SANTI, 2015).

Os resultados utilizando fucanas foram muito promissores, porque não alteraram a viabilidade das células, mas foram capazes de alterar a capacidade de invasão celular, o que é um evento chave para o processo de metástase. As fucanas são compostos obtidos de fontes renováveis e não apresentam efeito citotóxico, sendo possíveis candidatos ao desenvolvimento de novas terapias. No entanto, ainda não são conhecidos os possíveis efeitos sobre o melanoma em modelos *in vivo*, que foi a proposta do presente trabalho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGEM CELULAR

As células utilizadas nos experimentos foram de melanoma murino, da linhagem B16F10 (ATCC número CRL-6322), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em cultivo celular, em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), contendo penicilina 1 U/mL, estreptomicina 1 µg/mL, e anfotericina 2,5 µg/L, em atmosfera úmida a 37° C contendo 5% CO₂.

Para os ensaios realizados no ICESP/ FMUSP, em São Paulo, foram utilizadas células B16F10 (ATCC), cultivadas em garrafas (Corning), com meio RPMI (GIBCO 31600-026), suplementado com 10% de SFB (GIBCO, CAT 10270-106), sem antibióticos, e então mantidas em incubadora a 37°C, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂.

Para a inoculação das células nos animais, cultura de células B16F10 com 60 - 70% de confluência foram utilizadas, e estas foram desaderidas pela incubação por 5 minutos com 2,5 mM de tripsina em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4. A seguir, as células foram ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de SFB, para inibir a ação da tripsina.

Posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão PBS. A viabilidade celular foi verificada pelo método de Azul de Tripán, com o auxílio da câmara de Neubauer, sendo somente utilizadas suspensões de células que apresentaram viabilidade superior a 90%. A concentração de células foi ajustada para 5.10⁶ células viáveis/mL e as células foram mantidas em gelo até o momento da inoculação nos camundongos (máximo 1 hora, após a desadesão).

3.2 POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo testado foi a fucana A, extraída da alga *Spatoglossum schröderi* (Dictyotaceae), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, Depto. Bioquímica, UFRN.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Foram utilizados dois modelos de experimentação para avaliar o potencial antitumoral da fucana A, ambos utilizando células de melanoma murino (B16F10) em camundongos da linhagem C57BL/6. O primeiro modelo foi o de desenvolvimento de tumores sólidos subcutâneos, conforme metodologia utilizada por Ferrari de Andrade e colaboradores (2016) e Biscaia e colaboradores (2017), com modificações. E o segundo modelo foi de colonização ou metástase pulmonar, conforme metodologia descrita por Ferrari de Andrade e colaboradores (2016), com modificações.

Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 de 6 a 8 semanas de idade, foram adquiridos do Biotério da PUC/PR, do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz) e mantidos durante o experimento no biotério do Setor de Ciências Biológicas, UFPR. Também foram conduzidos ensaios no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) em parceria com Prof. Dr. Roger Chammas, para este foram utilizados camundongos machos de 6 a 8 semanas de idade. Vale destacar que a inclusão de fêmeas nos experimentos pré-clínicos foi adotada seguindo uma recomendação do *National Institutes of Health* (NIH) (CLAYTON e COLLINS, 2014).

Foram respeitados e seguidos todos os regimentos da Lei Nacional Nº 11.794, 8 de outubro de 2008, para o manejo científico de animais. Todas as práticas utilizadas no presente estudo foram realizadas somente após serem submetidas à análise e aprovadas pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEUA-UFPR) e da USP (CEUA-USP) (comprovantes em anexo 1, 2 e 3).

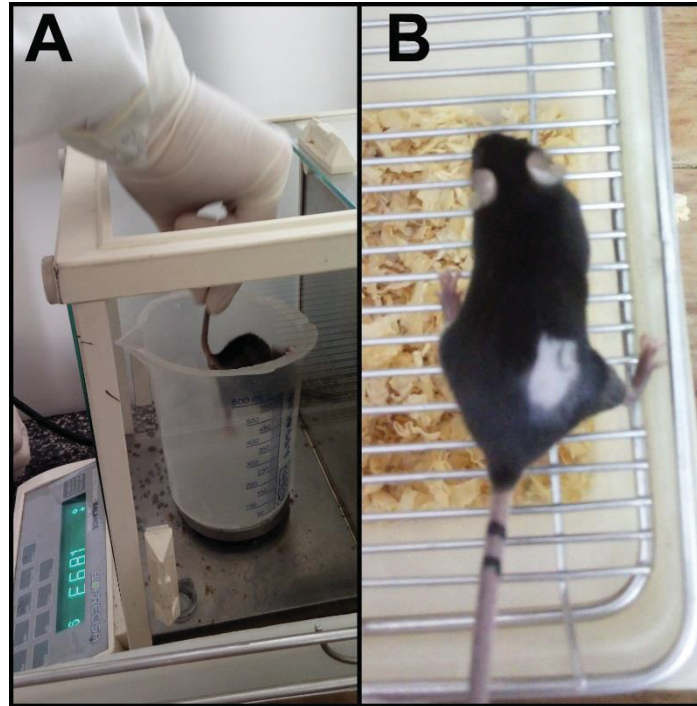
3.3.1 Modelo de tumores sólidos subcutâneos

Foram testadas as doses de 15, 30 e 100mg/Kg de fucana A sobre o desenvolvimento de tumores sólidos.

Para os experimentos realizados no biotério da UFPR, os animais foram separados em grupos com n de 5 a 10 animais dependendo da disponibilidade de fornecimento pelo biotério, enquanto que, nos experimentos realizados no biotério da FMUSP os grupos foram formados com n = 9. Após a separação em grupos, os animais foram devidamente identificados, pesados e depilados na região flanco dorsal direita (Figura 5). No dia seguinte, as células foram injetadas, em no máximo 1 hora

após a desadesão da placa de cultivo, para evitar a diminuição da viabilidade, conforme descrito no item 2.1.

FIGURA 5 – PREPARO DOS ANIMAIS PARA OS ENSAIOS REALIZADOS.



FONTE: O Autor (2018).

LEGENDA: Os animais foram pesados (A) e devidamente identificados (B), então a região flanco-dorsal direita no animal foi depilada para facilitar a inoculação das células tumorais, bem como possibilitar a medição do volume tumoral.

Para a inoculação das células tumorais, a pele previamente limpa foi pinçada e a agulha inserida subcutaneamente, injetando então 100 μ L da suspensão celular ($5 \cdot 10^5$ células viáveis em 100 μ L de PBS), cuidadosamente, até a formação de uma “bolha” sob a pele do animal. Em seguida o camundongo foi devolvido à sua caixa e o procedimento repetido até que todos os animais recebessem as células. O dia da inoculação foi identificado como o dia 0 (zero). O crescimento dos tumores foi acompanhado, a partir do 5º dia após tornarem-se palpáveis, e medidos diariamente até o final do experimento.

Foram utilizadas duas abordagens experimentais, o pré-tratamento ou tratamento preventivo (apenas para a dose de 30mg/Kg) e o pós-tratamento ou tratamento terapêutico (para todas as doses testadas).

Para os experimentos em que foi adotado o tratamento preventivo, os animais receberam injeções do tratamento pela via intraperitoneal, 48h, 24h e 2h antes da inoculação das células tumorais no dia 0, continuando diariamente até o dia 14.

Já para os animais dos experimentos com tratamento terapêutico, o início dos tratamentos ocorreu no 5º dia, após a inoculação das células, sendo realizado diariamente durante 10 dias.

A medição diária dos diâmetros perpendiculares dos tumores foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital (FORD), sendo possível acompanhar suas respectivas curvas de crescimento. No dia 15 os animais foram pesados, anestesiados via intraperitoneal com xilazina (10mg/kg – relaxante muscular) e cetamina (100 mg/kg - anestésico), de acordo com o painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association (Report of the AVMA Panel on Euthanasia - 2007)* e da Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 11 de Maio de 2012.

Após a anestesia, a cavidade abdominal foi aberta e o sangue coletado pela veia cava. Os animais foram então eutanasiados e, a seguir, foram retirados e pesados os seguintes órgãos: pulmão, fígado, rins, baço, adrenais e coração. Posteriormente, o tumor subcutâneo foi removido, pesado e preservado por congelação ou formalina 10% para a análise histológica e imunofluorescência.

Para estabelecer valores e referência, 5 animais saudáveis que não receberam células tumorais, nem qualquer tipo de tratamento foram pesados e eutanasiados. Foram coletados os órgãos e o sangue, para o cálculo dos índices de peso, o hemograma e perfil bioquímico. O grupo destes animais foi chamando de grupo Naive (controle normal).

3.3.2 Modelo de colonização experimental ou metástase pulmonar

Foram conduzidos dois experimentos independentes com n de 10 animais por grupo, onde foi testada a dose de 30mg/Kg com a abordagem do tratamento preventivo. Para tanto, os animais receberam injeções do tratamento pela via intraperitoneal, 48h, 24h e 2h antes da inoculação das células tumorais no dia 0 (zero), continuando diariamente até o dia 20.

No dia 0 (zero), os camundongos foram injetados com 5×10^5 células de melanoma B16F10, por via intravenosa, através da veia caudal lateral (Adaptado de GOMES, *et al.*, 2015; OVERWIJK e RESTIFO, 2001).

No dia 21 os animais foram pesados, anestesiados via intraperitoneal com xilazina (10mg/kg – relaxante muscular) e cetamina (100 mg/kg - anestésico), de

acordo com o painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association (Report of the AVMA Panel on Euthanasia - 2007)* e da Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 11 de Maio de 2012.

Após a anestesia, a cavidade abdominal foi aberta e o sangue coletado pela veia cava. O animal então foi eutanasiado e a seguir, foram retirados e pesados os seguintes órgãos: pulmão, fígado, rins, baço, adrenais e coração. Os pulmões foram fixados em paraformaldeído à 4% *overnight*, e o número de focos de metástase em toda a superfície dos pulmões foi contado com o auxílio de um estereomicroscópio. Posteriormente, os pulmões foram preservados por congelação para processamento histológico.

3.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Com o intuito de avaliar possíveis efeitos adversos da fucana A no organismo animal, foram avaliados alguns parâmetros fisiológicos como: o peso dos órgãos coletados em relação ao peso corporal do animal, hemograma e perfil bioquímico.

A análise do peso dos órgãos foi realizada adotando um índice calculado de acordo com a fórmula: índice de peso dos órgãos = peso do órgão (mg) / peso corporal (g) (TANG *et al*, 2016).

Para o hemograma foram avaliados leucócitos totais, linfócitos, monócitos, glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas.

Com relação ao perfil bioquímico, o plasma foi obtido após centrifugação do sangue a 3000g durante 10 minutos, e então determinado as dosagens de ALT, AST, fosfatase alcalina, colesterol, triglicerídeos, creatinina e ureia. Estes parâmetros foram detectados utilizando um analisador químico (Mindray BS-200), de acordo com as instruções do fabricante do kit (Kovalent, Reagelabor). As análises bioquímicas e hemograma foram realizadas no Hospital Veterinário da UFPR, sob a responsabilidade da Prof. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich, e do MSc. Olair Carlos Beltrame.

3.5 ANÁLISE MORFOLOGICA DOS TECIDOS

Após a fixação por paraformaldeído 4%, os órgãos e tumores coletados (item 3.3) foram colocados por 24h em solução de sacarose 30% para serem então

congelados em freezer à – 80°C. Em seguida os tumores ou pulmões com nódulos foram emblocados em Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura® Finetek), cortados à 10 µm em criostato Leica CM1860 à – 20°C, corados com Hematoxilina e eosina (HE) ou processados para marcação de imunofluorescência.

Os órgãos fixados em formalina 10% foram encaminhados para processamento histológico de rotina, isto é, foram desidratados, emblocados em parafina, cortados no micrótomo e corados com HE.

Após o processamento, todos os cortes histológicos corados com HE foram fotografados utilizando o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/Slide (Metasystems, Altussheim, DE).

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os tumores coletados e preservados por congelação foram emblocados em Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura® Finetek) e cortados à 10 µm em criostato Leica CM1860. Os cortes foram então processados para imunofluorescência, com o anticorpo primário anti-VEGF (Thermo Fisher Scientific) monoclonal de cabra e anticorpo secundário anti-goat conjugado com Alexa Fluor 488. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/Slide (Metasystems, Altussheim, DE). Para a quantificação de Ki-67, os cortes foram marcados utilizando-se o anticorpo primário anti-Ki-67 (Thermo Fisher Scientific) monoclonal de coelho e anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com Texas Red. As imagens foram obtidas utilizando o sistema de imagem confocal A1R MP+ (Nikon, Tokyo, Japão).

3.6.1 Análise de imagem das imunofluorescência.

Para a quantificação de VEGF, as imagens obtidas foram analisadas utilizando o programa FIJI (SCHINDELIN *et al.*, 2012) para quantificação da intensidade de fluorescência de cada corte como um todo. A partir das imagens dos controles secundários da reação de imunofluorescência, tanto o *background* como a marcação inespecífica foram calculados e removidos das imagens de interesse por *threshold*, obtendo-se a área correspondente à marcação e a somatória das

intensidades de fluorescência foi calculada. O valor da somatória de intensidade de fluorescência foi dividido pela área tecidual e o valor de intensidade/área foi comparado entre os grupos.

Para a quantificação do Ki-67, foram obtidas 10 regiões aleatórias dos cortes de tecido tumoral e a quantidade de células com marcação Ki-67 positivas foi quantificada manualmente e dividida pela área total analisada utilizando-se o programa FIJI (SCHINDELIN *et al.*, 2012), obtendo o número de células Ki-67 positivas por mm².

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

O volume tumoral foi medido diariamente com o paquímetro digital e calculado de acordo com a equação: Volume tumoral (cm³) = 0,52 x d² x D, onde d representa o diâmetro menor e D o diâmetro maior e 0,52 é o fator do cálculo do volume da elipse (DE AGUIAR *et al.*, 2016).

A taxa de inibição do tumor foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: índice de inibição do crescimento tumoral (ICT) = (1 – média de peso dos tumores do grupo tratado / média de peso do grupo controle) x 100% (TANG *et al.*, 2016).

A análise estatística foi realizada no software Prism 6 para Windows (Versão 6.01, GraphPad Software) a partir de testes não paramétricos, pareado (Wilcoxon matched pairs test, two tailed) para análise da curva de crescimento tumoral. Os dados diários de volume foram analisados no software Prism 6 e ajustados para uma curva de regressão não linear, que descreve o crescimento exponencial dos tumores, calculando o tempo necessário para que os tumores dobrem de volume (tempo de dobramento). O tempo de dobramento tumoral de cada animal foi calculado separadamente, e foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico e não pareado (Mann Whitney), assim como os demais dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho a fucana A foi avaliada quanto sua capacidade de inibir tanto o desenvolvimento de tumor pré-estabelecido, numa ideia de tratamento terapêutico, quanto a formação de novos tumores, isto é, num conceito de tratamento preventivo.

4.1 FUCANA A COMO POSSÍVEL TRATAMENTO TERAPÊUTICO

Inicialmente vale destacar que o conceito de tratamento terapêutico, neste trabalho, foi adotado numa hipótese de um futuro tratamento após o surgimento dos sintomas e a descoberta da presença do tumor primário. Para tanto, foi utilizado o modelo *in vivo* de tumor sólido subcutâneo e o tratamento iniciou-se 5 dias após a inoculação das células de melanoma, quando os tumores crescem o suficiente para tornarem-se palpáveis. Portanto, nestes casos, o tratamento se deu após a formação do tumor.

4.1.1 Determinação da dose para tratamento terapêutico

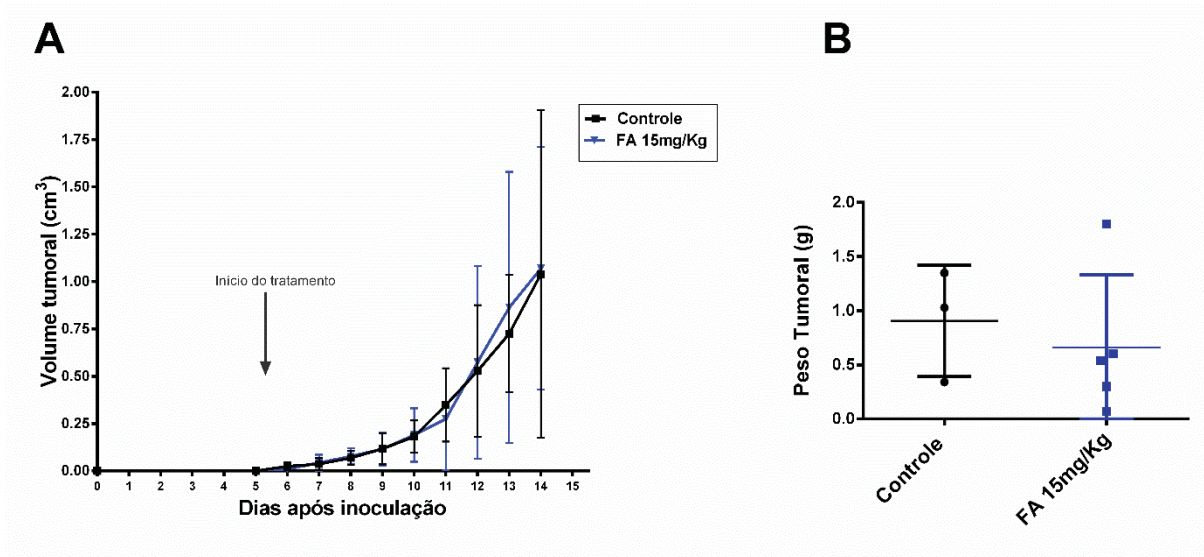
4.1.1.1 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 15mg/kg de fucana A sobre o crescimento tumoral.

Baseado no trabalho de Barroso e colaboradores (2008) sobre o efeito antitrombótico apresentado pela fucana A, foi eleita a dose de 15 mg/kg desse polissacarídeo para avaliar seu efeito sobre o crescimento dos tumores sólidos subcutâneos.

Quando comparado ao grupo controle, não houve diferença significativa na curva que representa o crescimento dos tumores do grupo FA 15 mg/kg ($p > 0,05$) (gráfico 2A), assim como não foi observada diferença significativa entre o peso tumoral (gráfico 2B).

Na avaliação dos índices de peso dos órgãos não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre nenhum dos tratamentos em relação ao controle (Dados não mostrados).

GRÁFICO 2 – EFEITO DO TRATAMENTO COM A DOSE DE 15mg/kg DE FUCANA A SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL.



FONTE: O Autor (2018)

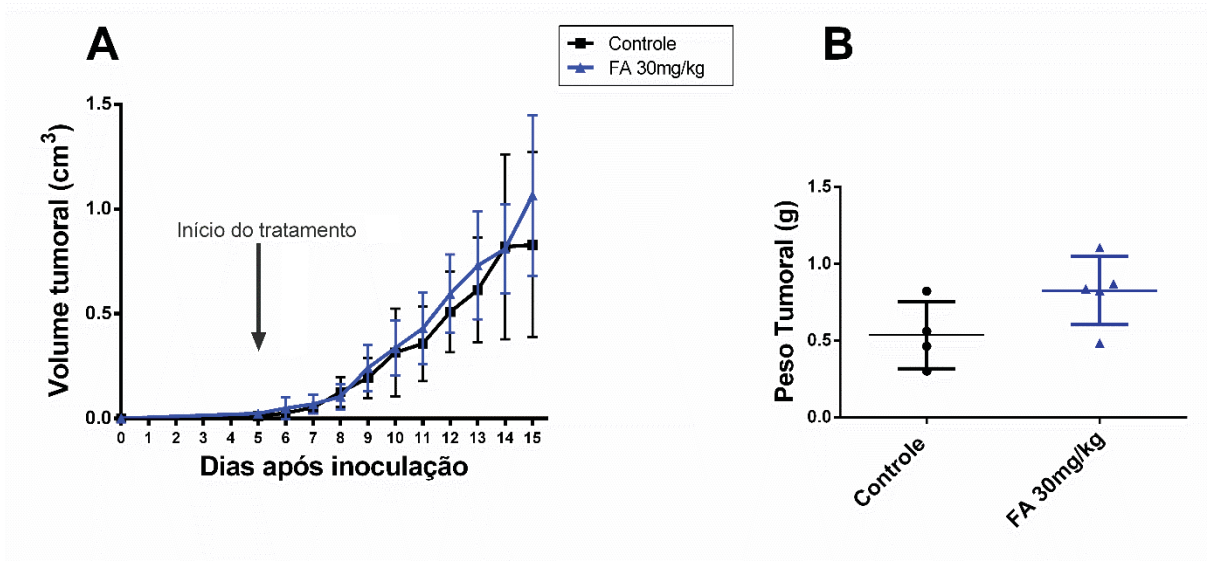
LEGENDA: A – Curva de crescimento tumoral comparando o volume tumoral em cm³ no grupo FA 15 mg/kg em relação ao controle (PBS). B - Peso dos tumores em g, no último dia do experimento. Foram realizados dois experimentos independentes, contendo um “n” de 5 animais por grupo em cada um deles. O gráfico acima é representativo de um dos experimentos. *p<0,05. FA = fucana A. A dose de 15 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

Como a dose de 15mg/kg não apresentou efeito relevante sobre a inibição do crescimento tumoral, o próximo passo foi avaliar doses maiores, iniciando pelo dobro (30mg/kg) daquela testada anteriormente.

4.1.1.2 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 30mg/kg de fucana A sobre o crescimento tumoral.

Conforme ilustrado nas curvas que representam o crescimento tumoral (gráfico 3A), o volume dos tumores no grupo tratado com 30mg/kg de fucana A acompanhou a curva de crescimento do grupo controle, não diferindo significativamente deste ($p > 0,05$). Ao final do experimento, os pesos dos tumores do grupo FA 30 mg/kg também não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle ($p > 0,05$) (gráfico 3B).

GRÁFICO 3 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM AS DOSES DE 30mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL.



FONTE: O Autor (2018)

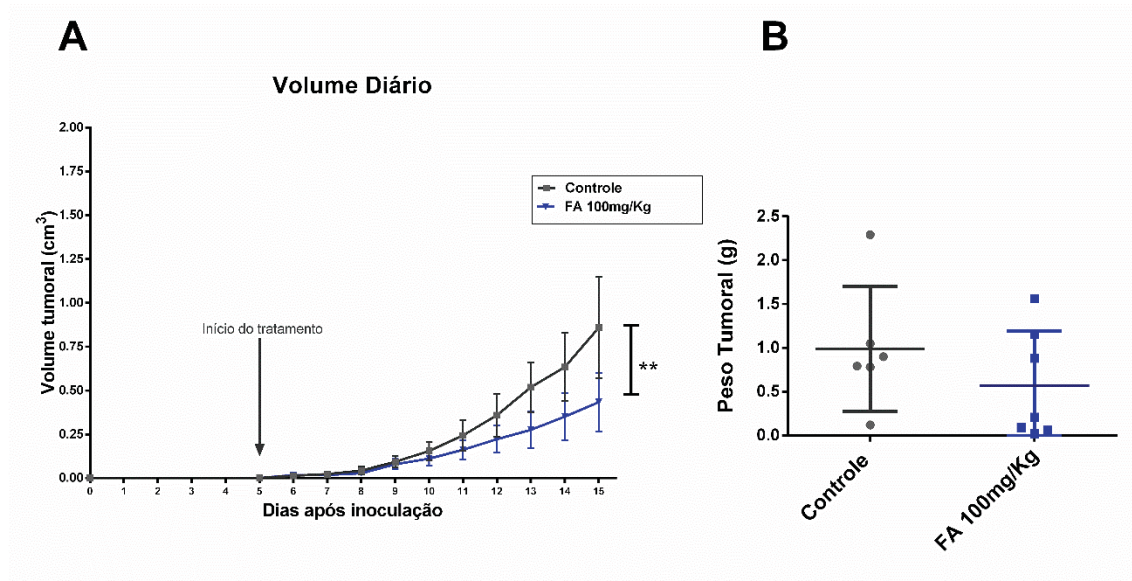
LEGENDA: A – Curva de crescimento tumoral mostrando a diferença no volume em cm^3 dos tumores tratados em comparação ao controle. B - Peso dos tumores em g. FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

Como a dose de 30mg/kg também não apresentou interferência sobre crescimento tumoral, o próximo passo foi aumentar a dose para 100mg/kg.

4.1.1.3 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 100mg/kg de fucana A sobre o crescimento tumoral.

O tratamento terapêutico com 100 mg/kg de fucana A mostra que a curva de crescimento tumoral difere significativamente ($p < 0,01$) em relação ao controle (gráfico 4A). Avaliando-se a inibição do crescimento tumoral pela média de seu volume, o índice de inibição de crescimento tumoral (ICT) deste tratamento foi de 49,54%. Entretanto na comparação do peso final dos tumores não houve diferença significativa em relação ao controle (gráfico 4B).

GRÁFICO 4 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM A DOSE DE 100 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL.

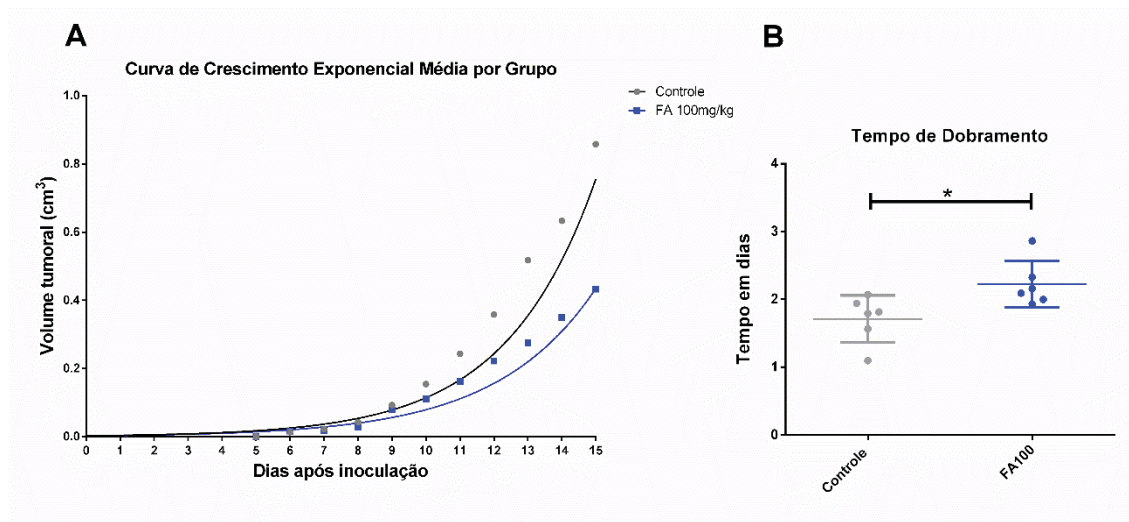


FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: **A** – Curva de crescimento tumoral mostrando a diferença no volume em cm³ dos tumores tratados em comparação ao controle (** P < 0,01). Os dados são expressos em média ± SD por grupo. **B** - Peso dos tumores em g, não apresentam diferença estatística (P > 0,05). Foram utilizados camundongos em grupos com n = 7. FA = fucana A. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

Os dados do desenvolvimento tumoral foram reanalisados utilizando regressão não linear, o que permitiu calcular a equação que descreve a curva de crescimento exponencial (gráfico 5A). A partir da equação que descreve o desenvolvimento tumoral de cada indivíduo foi possível calcular o tempo, em dias, necessário para o tumor dobrar de volume. Com esta forma de análise pode-se verificar que houve uma diferença no tempo de dobramento dos tumores, sendo de $1,7 \pm 0,35$ dias nos animais do controle, para $2,23 \pm 0,34$ dias nos animais tratados com a dose de 100mg/kg de fucana A. Isto nos mostra claramente que esses tumores crescem mais lentamente, quando comparados com aqueles dos animais do grupo controle, diferindo significativamente deste ($p < 0,05$) (gráfico 5B).

GRÁFICO 5 – CURVAS DE CRESCIMENTO TUMORAL E TEMPO DE DOBRAMENTO.



FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: **A** – Curva de crescimento exponencial calculado a partir das médias por grupo evidenciando a diferença entre o tratamento com a dose de 100mg/kg de fucana A e o controle. **C** – Tempo de dobramento, isto é, o tempo em dias necessário para que os tumores dobrem o seu volume. Os tumores do grupo tratado com 100mg/kg de fucana A apresentaram um tempo de dobramento significativamente maior do que os tumores do grupo controle ($p < 0,05$). FA = fucana A. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

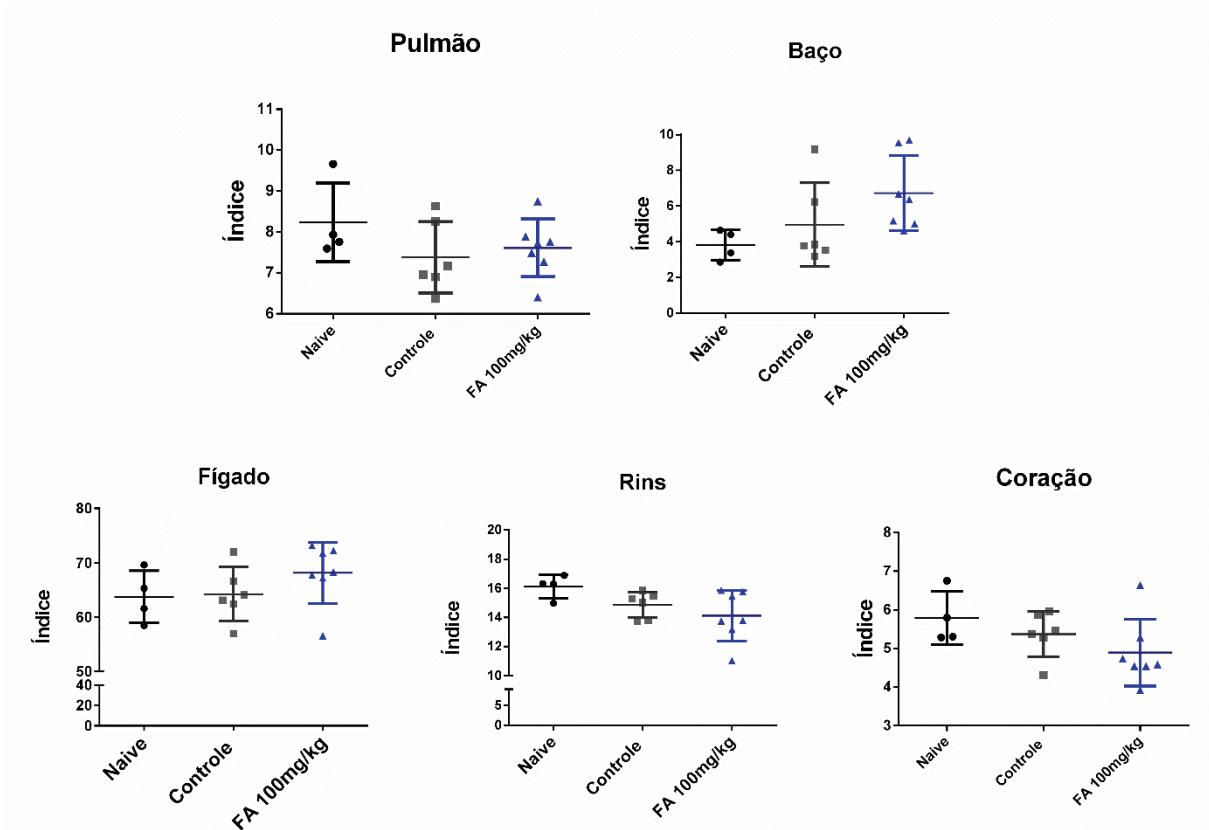
Após a análise das curvas de crescimento e do tempo de dobramento verificou-se que a fucana A foi capaz de inibir o crescimento de tumores sólidos pré-estabelecidos de melanoma murino na dose de 100mg/kg, sendo desta forma estabelecido uma dose terapêutica. O próximo passo foi avaliar os possíveis efeitos adversos que a fucana A pudesse apresentar. Para isso foram analisados os seguintes parâmetros fisiológicos: índice de peso de órgãos, perfil hematológico e bioquímico.

4.1.2 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 100mg/kg de fucana A sobre os parâmetros fisiológicos em camundongos

Foi estabelecido um grupo sem tumor e sem tratamento, grupo Naive, para comparar os índices de peso dos órgãos e os perfis, bioquímico e hematológico, de animais em condições “normais” com os animais que receberam células tumorais.

Os índices de peso dos órgãos avaliados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos Naive, tratamento e controle ($p > 0,05$) (gráfico 6).

GRÁFICO 6 – EFEITO DO TRATAMENTO TERAPÊUTICO COM A DOSE DE 100 mg/kg DE FUCANA A SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS.

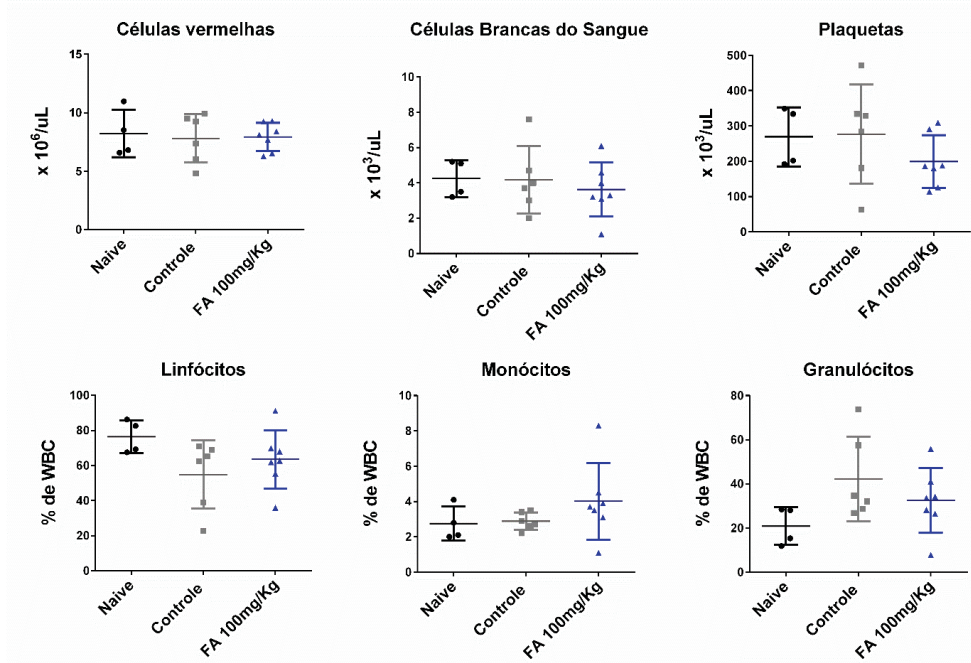


FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão para o índice de peso dos órgãos coletados em mg/g. Foi observada diferença significativa no índice de peso dos fígados em relação ao controle (* $p < 0,05$), contudo, não ocorreu diferença estatística entre controle e tratado para os demais órgãos ($p > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

O perfil hematológico (gráfico 7) do grupo tratado com 100 mg/kg de fucana A não apresentou diferença significativa em relação aos parâmetros analisados no controle e no grupo Naive ($p > 0,05$). Contudo, quando foi analisado o perfil bioquímico, pode-se notar que os animais portadores de tumores tiveram alterações em AST/TGO (com maiores concentrações) ao comparar-se o grupo controle com o grupo Naive. No entanto, o grupo tratado não difere significativamente entre os outros grupos. O tratamento com fucana A levou a uma redução significativa nos níveis séricos da fosfatase alcalina quando comparados ao grupo Naive e ao grupo controle ($p < 0,01$) (gráfico 8).

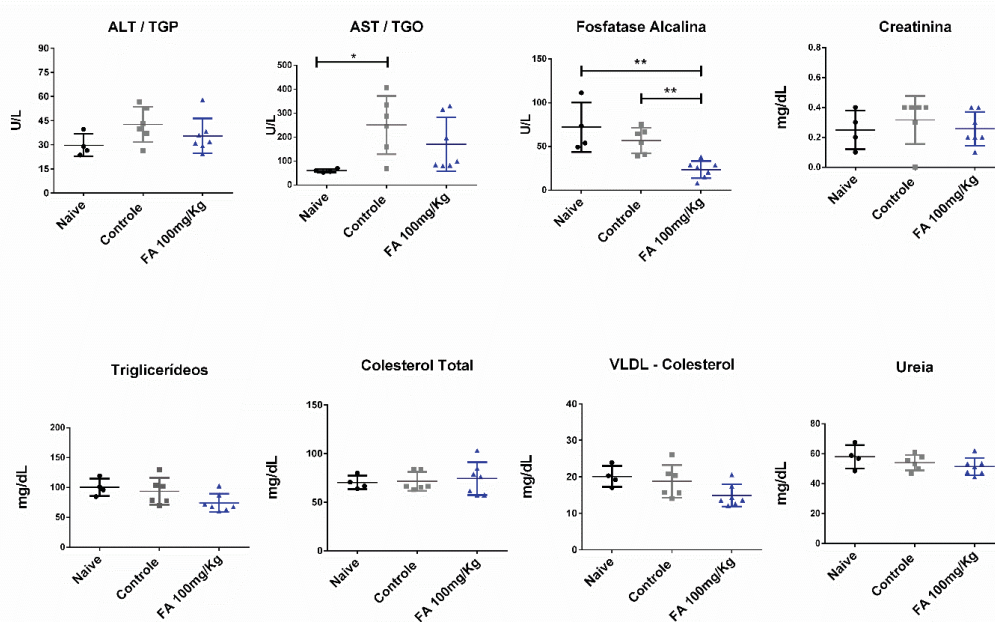
GRÁFICO 7 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM 100 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL HEMATOLÓGICO.



FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão. Não foi observada diferença estatística entre controles e tratados ($p > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

GRÁFICO 8 – EFEITO DOS TRATAMENTOS COM 100 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO.



FONTE: O Autor (2018)

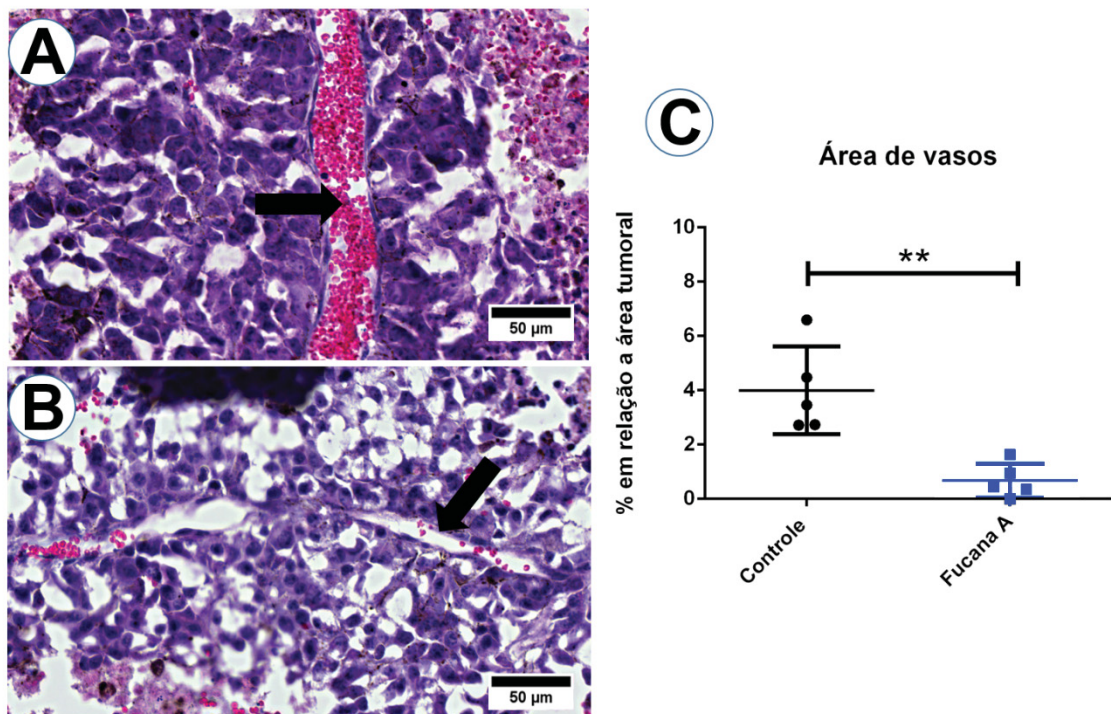
LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão. Não foi observada diferença estatística entre controles e tratados ($p > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

Como os resultados mostram que a dose de 100 mg/kg fucana A não provoca alterações dos parâmetros fisiológicos que indique um efeito adverso, o próximo passo foi realizar a análise histológica dos tumores e investigar marcadores relacionados ao desenvolvimento tumoral.

4.1.3 Efeito do tratamento terapêutico da dose de 100mg/kg de fucana A sobre a morfologia dos tumores

Para a quantificação da porcentagem de área de vasos e da área de morte em relação a área total, os tumores foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.). Na avaliação morfológica da área de vasos sanguíneos (figura 6A e 6B) pode-se observar uma redução significativa ($p < 0,01$) de 83,25% na média das áreas de vasos presentes nos tumores dos animais que receberam o tratamento com 100mg/kg de fucana (0,67%) quando comparado com média do controle (4%).

FIGURA 6 – QUANTIFICAÇÃO MORFOLOGIA DA ÁREA DE VASOS SANGUÍNEOS



FONTE: O Autor (2018)

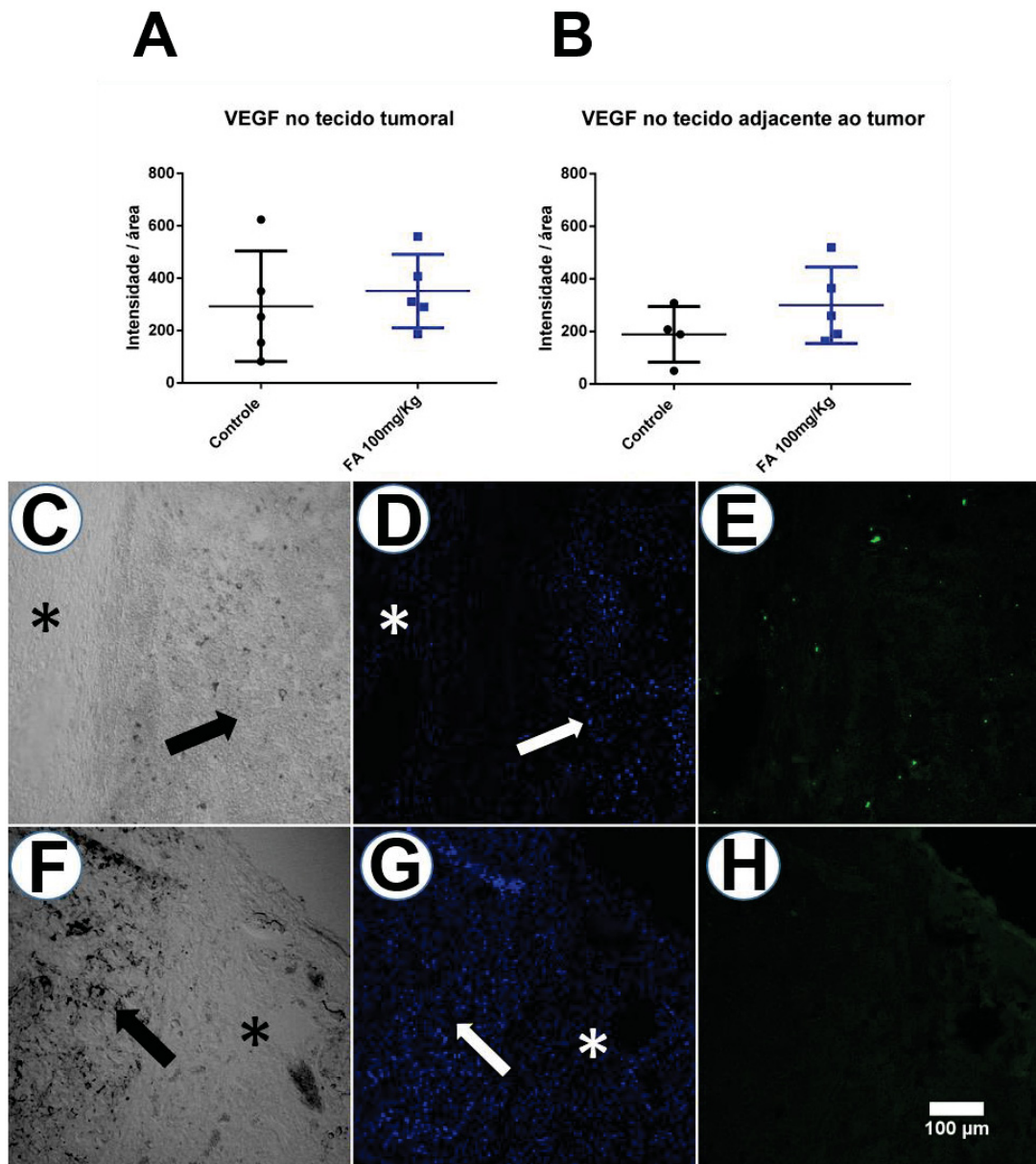
LEGENDA: Imagem representativa do corte histológico, que foi inteiramente documentado utilizando scanner de lâminas histológicas. Tecidos tumorais corados com H.E. Na avaliação da área de vasos sanguíneos verifica-se que há diferença significativa entre o grupo controle e o tratamento ($p < 0,01$). **A** – Controle; **B** – Tratado com 100mg/kg de Fucana A; **C** – Médias + SD da porcentagem da área de vasos sanguíneos, em relação a área total do tumor no corte histológico. (→) Vasos sanguíneos

intratumorais. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

Com a redução da área de vasos intratumorais nos animais tratados com 100mg/kg de fucana A, o próximo passo foi quantificar a presença de VEGF por imunofluorescência, tanto nas amostras, provenientes do tecido tumorais (figura 7C), quanto daquelas referentes ao tecido conjuntivo adjacente ao tumor (figura 7F).

A intensidade da marcação do VEGF presente dos animais tratados com fucana A não difere significativamente daquela observada nas amostras do controle ($p > 0,05$) nos dois tipos de tecidos analisados (tumoral e tecido conjuntivo adjacente ao tumor) (figura 7A e 7B).

FIGURA 7 – QUANTIFICAÇÃO VEGF NO TECIDO TUMORAL E NO TECIDO ADJACENTE AO TUMOR.

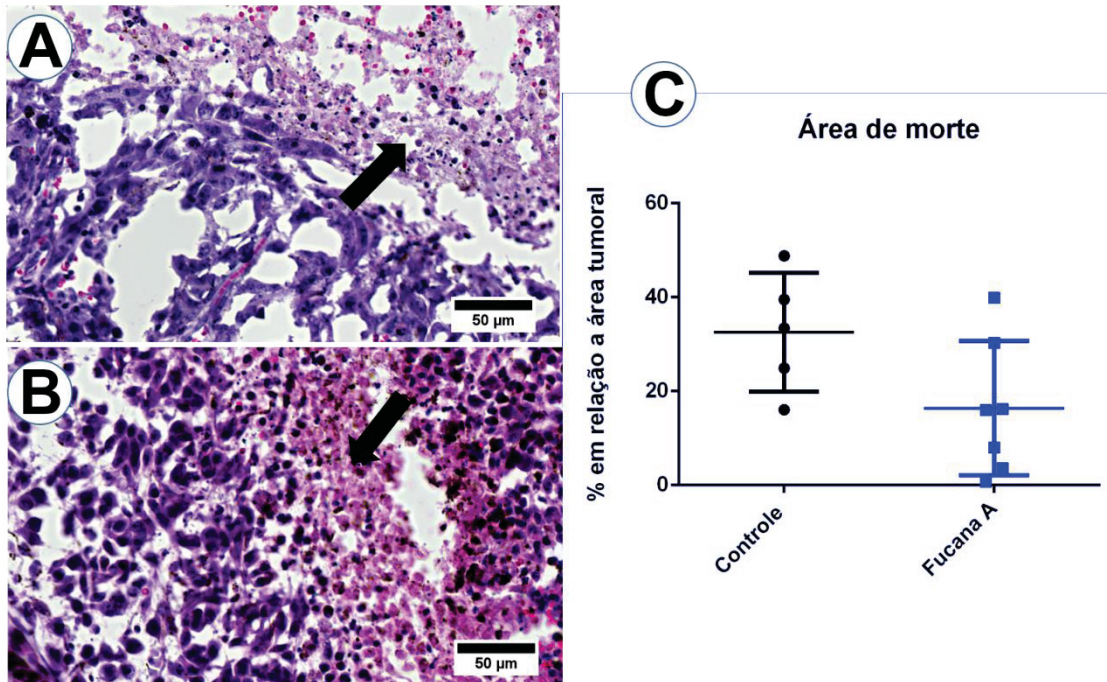


FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: A e B – Gráficos de dispersão de pontos, ilustrando média e desvio-padrão da intensidade de fluorescência das imunomarcações de VEGF, dividida pela área dos tumores ou dos tecidos adjacentes aos tumores. Não foram observadas diferenças significativas entre a intensidade de marcação de VEGF dos animais tratados com 100mg/kg fucana A e daqueles do grupo controle ($p > 0,05$). A – Intensidade de fluorescência por área nos tecidos tumorais. B – Intensidade de fluorescência por área nos tecidos adjacentes aos tumores. C à H – Imagens de microscopia confocal nas quais é possível identificar os tecidos tumorais (→) e os tecidos adjacentes aos tumores (*) e quantificar a intensidade de marcação fluorescente. C – Contraste de interferência diferencial – DIC do grupo controle; D – Núcleos marcados com Dapi do grupo controle; E – Marcação imunofluorescente de VEGF do controle; F – DIC do grupo tratado com 100mg/kg de fucana A; G – Núcleos marcados com Dapi do grupo tratado com fucana A; H – Marcação imunofluorescente de VEGF do grupo tratado com fucana A. FA = fucana A. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

Na avaliação morfológica da área de morte tecidual (figura 8), o tratamento com fucana A apresentou média menor (16,37%) quando comparada com a média do controle (32,55%), contudo após análise estatística com o teste Mann Whitney verificou-se que o tratamento não difere estatisticamente do controle ($p > 0,05$).

FIGURA 8 – QUANTIFICAÇÃO MORFOLOGIA DA ÁREA DE MORTE

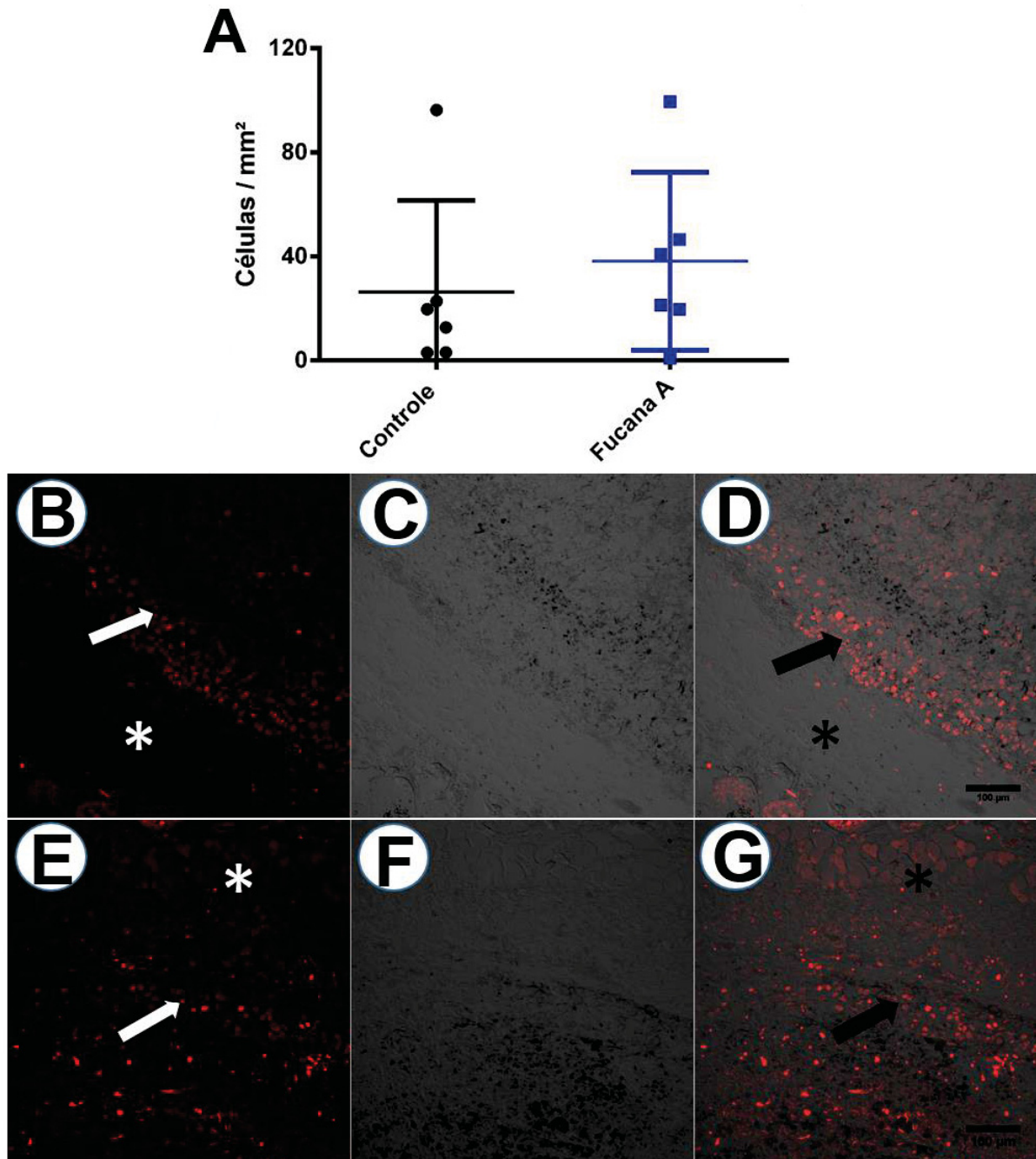


FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Tecidos tumorais corados com H.E. Na avaliação da área de morte não há diferença estatística entre controle e tratamento ($p > 0,05$). A – Controle; B – Tratado com 100mg/kg de Fucana A; C – Médias + SD das áreas de morte em porcentagem da área total do tumor. (→) Regiões de morte celular. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

Para a avaliação da proliferação celular foi realizada a marcação imunofluorescente de Ki-67 presente nos tumores (figura 9). O número de células em proliferação nos tumores dos animais tratados com 100mg/kg de fucana A foi de 38,17 células por mm^2 ($\pm 34,22$), enquanto que nos controles foi de 26,31 células por mm^2 ($\pm 35,28$). Estes valores não diferem estatisticamente entre si, quando analisados pelo teste Mann Whitney ($p > 0,05$).

FIGURA 9 – QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DE KI-67 NO TECIDO TUMORAL



FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: A – Gráfico de dispersão de ponto ilustrando média e desvio-padrão do número de núcleos positivos para a imunomarcações de Ki-67 divididas pela área dos tumores. Não foram observadas diferenças significativas entre número de núcleos Ki-67 positivos por mm² dos animais tratados com 100mg/kg fucana A e os animais do grupo controle ($p > 0,05$). B à G – Imagens de microscopia confocal nas quais é possível identificar os tecidos tumorais positivamente marcados (→) e os tecidos adjacentes aos tumores (*). B – Marcação imunofluorescente de Ki-67 do controle; C – Contraste de interferência diferencial – DIC do grupo controle; D – Sobreposição das imagens de fluorescência e de DIC - controle; E – Marcação imunofluorescente de Ki-67 do grupo tratado com 100mg/kg de fucana A; F – DIC do grupo tratado com fucana A; G – Sobreposição das imagens de fluorescência e de DIC do grupo tratado com fucana A. FA = fucana A. A dose de 100 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir do 5º dia após a inoculação das células tumorais.

4.1.4 Discussão dos resultados do tratamento terapêutico

Os estudos prévios com fucana A, realizados por Santi (2015), foram restritos aos ensaios *in vitro*, mas foram suficientes para sugerirem que este polissacarídeo apresenta uma atividade biológica sobre as células de melanoma murino. Para avaliar se essa ação ocorre quando o melanoma está presente *in vivo*, onde os parâmetros e variáveis aumentam em complexidade, foi realizada uma série de experimentos com o modelo de tumor sólido subcutâneo em camundongos.

Nos resultados obtidos no presente trabalho (com tumor sólido), observou-se que as doses 15 e 30mg/kg de fucana A não apresentaram ação antitumoral terapêutica. Entretanto, a dose de 100 mg/kg foi capaz de inibir o crescimento tumoral em cerca de 50%.

Para investigar os motivos pelos quais fucana A leva a esta redução do desenvolvimento tumoral, buscou-se na literatura trabalhos com polissacarídeos similares e seus efeitos *in vivo*. Uma possibilidade seria em decorrência da redução da angiogênese, que já foi relatada para outros polissacarídeos sulfatados similares às fucanas, entre eles a heparina e as fucoïdanas. Neste sentido, destaca-se o trabalho de Lee e colaboradores (2009), que descrevem a redução do volume tumoral e da angiogênese produzida pela heparina em modelo de tumor sólido de melanoma murino (B16F10), de carcinoma murino de células escamosas (SCC7) e de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC1), por sua interação com fatores de crescimento como o VEGF e o FGF. Xue e colaboradores (2012), utilizando células de câncer de mama (4T1) de camundongos em modelo *in vivo*, descrevem que a fucoïdana possui uma ação antiangiogênica, por reduzir a expressão de VEGF nos tumores sólidos.

No presente trabalho também observou-se que fucana A leva a uma menor formação de vasos sanguíneos intratumorais. No entanto, essa ação antiangiogênica parece não ser decorrente da disponibilidade de VEGF, tendo em vista que sua marcação nos tumores tratados, não diferiu da marcação dos controles, sendo necessário procurar novas abordagens para propor um mecanismo de ação para a menor formação de vasos sanguíneos que foi observada. Por outro lado, uma menor angiogênese pode levar ao menor desenvolvimento do tumor devido a menor disponibilidade de nutrientes, o que conseqüentemente poderia levar a morte celular.

Essa hipótese foi verificada no presente trabalho. No entanto, quando foi avaliado nos cortes histológicos, observou-se que o tratamento com fucana A não

resultou em aumento de regiões de morte celular no modelo de tumores sólidos. Esse resultado corrobora com os dados de Ferreira (2012) e Santi (2015), os quais mostram que essa molécula não se apresenta citotóxica e nem altera a viabilidade das células de melanoma murino em cultura (linhagem B16F10). Embora na literatura observa-se que as fucoidanas podem interagir com componentes das vias de sinalização da apoptose (ATASHRAZM *et al.*, 2015) e, adicionalmente, Ale e colaboradores, demonstraram que as fucoidanas brutas extraídas de *Sargassum* sp. de *F. vesiculosus*, são capazes de induzir a apoptose em células da linhagem B16 de melanoma. Devemos lembrar que o tanto a fucana A como as fucoidanas são polissacarídeos sulfatados ricos em fucose sendo que esta pode estar substituída em maiores ou menores graus por outros monossacarídeos como xilose, ácido glucurônico e outros. E, apesar de suas similaridades na composição sacarídica, apresentam diferenças estruturais, podendo explicar a razão pela qual a ação apoptótica pode não ser generalizada para todos heteropolissacarídeos sulfatados contendo fucose, uma vez que a fucana A não apresenta essa ação.

Por outro lado, quando se observa a curva de crescimento tumoral, dos tumores de animais tratados com fucana A verifica-se que houve diferença significativa quando comparada com o controle. Calculando-se o tempo de dobramento pode-se observar que o tratamento com fucana A elevou o tempo em que o tumor leva para dobrar de tamanho, passando de 1,7 para 2,23 dias, o que resultou ao final do experimento em tumores com cerca de metade do tamanho daqueles apresentados pelo grupo controle. Apesar da redução no volume tumoral, ao analisar a proliferação celular (com o marcador Ki-67) não houve diferença significativa no número de células marcadas por mm² quando o tratamento com fucana A é comparado ao controle.

Este conjunto de dados (alteração da angiogênese, sem levar a morte celular, mas reduzindo o crescimento tumoral) sugerem que a fucana A possivelmente interfere no ciclo celular. Deve-se levar em consideração o fato de que não houve alteração na marcação com Ki-67, o que sugere que as células não estão em G0 (período de latência), mas que fucana A leva, na verdade, a um retardo dos eventos do processo de divisão, contudo, sem interrompê-lo. Corroborando com essa ideia, há o trabalho de Park e colaboradores (2014), no qual é descrita a ação de uma fucoidana comercial, mostrando que esta também é capaz de interferir na progressão do ciclo celular, aumentando a porcentagem de células que permanecem em G1. O

mecanismo responsável pelo aumento da porcentagem de células nessa fase do ciclo celular envolve a regulação de CdKs/ciclinas: como a redução das Ciclinas D1 e, o aumento da Cdk inibidora de p21 e a desfosforilação da proteína retinoblastoma (pRB), essenciais para a transição de G1 para S (Park *et al.*, 2014). Essa avaliação pode ser analisada, em trabalho futuros, utilizando uma abordagem que emprega a dissociação das células da massa tumoral e, uma vez em suspensão podem ser avaliadas em ensaio com marcação do conteúdo de DNA e análise em citometria de fluxo, conforme descrito previamente por nosso grupo (Ferrari de Andrade, *et al.* 2016).

Assim, os mecanismos da atividade antitumoral da fucana A ainda são desconhecidos, e necessitam mais estudos para serem elucidados.

Por outro lado, a inibição sobre o desenvolvimento tumoral observada pela fucana A, não é acompanhada de alterações fisiológicas importantes, tendo em vista que com este composto não foram observadas alterações tanto no índice de peso dos órgãos, quanto nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, o que sugere sua segurança quanto a possíveis efeitos adversos.

4.2 FUCANA A COMO POSSÍVEL TRATAMENTO PREVENTIVO

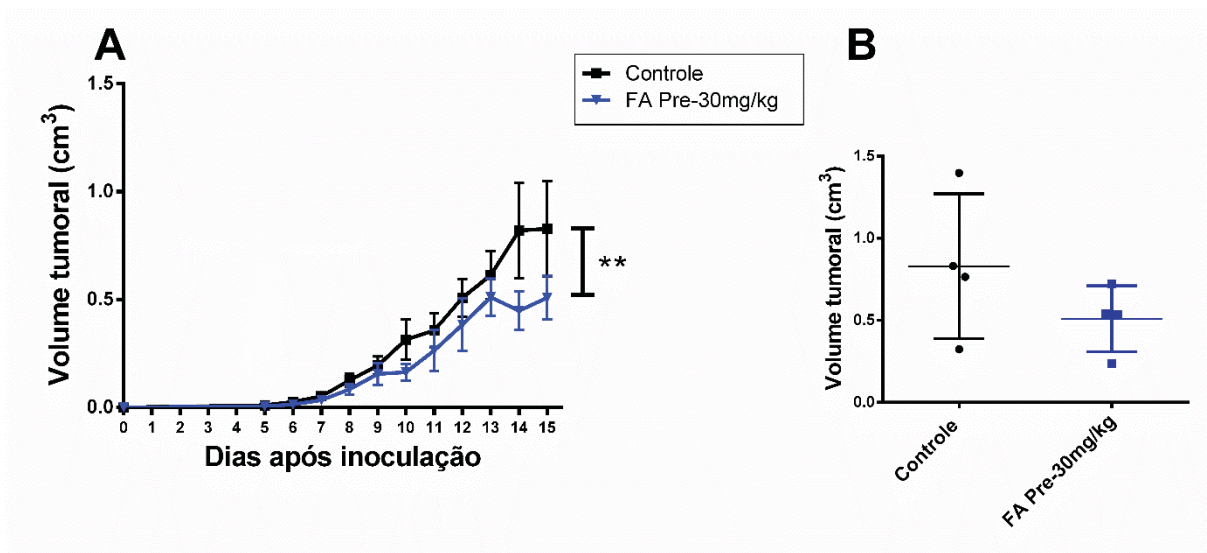
Uma vez que as algas marrons são uma fonte recorrente de compostos naturais bioativos, o consumo destas algas, bem como o uso de seus extratos ou de compostos isolados, pode contribuir para reduzir a incidência de câncer (FITTON, STRINGER e KARPINIEC, 2015). Assim, considerando que fucana A é obtida de algas marrons, buscou-se verificar se esse polissacarídeo poderia apresentar efeito preventivo no desenvolvimento do câncer, em especial no melanoma, que é o nosso objeto de estudo.

Vale destacar que o protocolo de tratamento do melanoma humano se inicia com a remoção cirúrgica do tumor primário (WAGNER *et al.*, 2000), e o início de um tratamento, que previna ou retarde o surgimento de tumores secundários, é de grande relevância. Desta forma, o tratamento preventivo foi abordado em dois modelos *in vivo*, utilizando o modelo de tumor sólido subcutâneo e o modelo de colonização e/ou metástase pulmonar. Adicionalmente, como foi um tratamento no qual os animais receberam o polissacarídeo por mais tempo, optou-se por iniciar com a dose de 30mg/kg.

4.2.1 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre o crescimento tumoral em modelo de tumor sólido

O tratamento preventivo foi iniciado 48h antes da inoculação das células da linhagem B16F10 (adaptado de JIANG *et al.*, 2014), utilizando a dose de 30 mg/kg de fucana A. Os resultados estão ilustrados no gráfico 9, onde observa-se que nessa condição a fucana A foi capaz de inibir o crescimento tumoral (ICT) em 33,13% e a curva da evolução do volume tumoral difere significativamente ($p < 0,01$) em relação ao controle (gráfico 9A). Entretanto, na comparação do peso final dos tumores não houve diferença significativa (gráfico 9B).

GRÁFICO 9 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O CRESCIMENTO TUMORAL



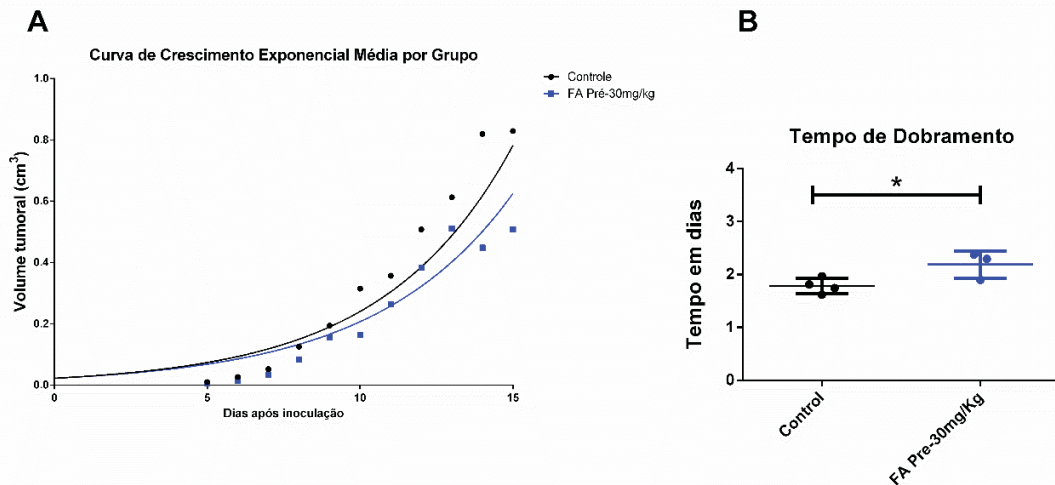
FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: A – Curva de crescimento tumoral mostrando a diferença no volume em cm^3 dos tumores tratados em comparação ao controle. B - Peso dos tumores em mg. ** $p < 0,01$ FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

Os dados do experimento foram reanalisados através de regressão não linear (gráfico 10A), que como já descrito anteriormente, ao permitir o cálculo da equação que descreve uma curva de crescimento exponencial, possibilita observar as diferenças apontadas pelos dados relativos ao aumento do volume do tumor. Os dados mostraram que o tempo de dobramento dos tumores passou de 1,78 dias ($\pm 0,15$) nos animais do grupo controle, para 2,19 dias ($\pm 0,26$) nos animais tratados preventivamente com a dose de 30 mg/kg de fucana A. A exemplo do que foi verificado

no tratamento terapêutico, o tratamento preventivo com 30 mg/kg de fucana A, também resulta no crescimento mais lento dos tumores, quando comparados com o grupo controle, diferindo significativamente deste ($p < 0,05$) (gráfico 10B).

GRÁFICO 10 – CURVAS DE CRESCIMENTO TUMORAL E TEMPO DE DOBRAMENTO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A



FONTE: O Autor (2018)

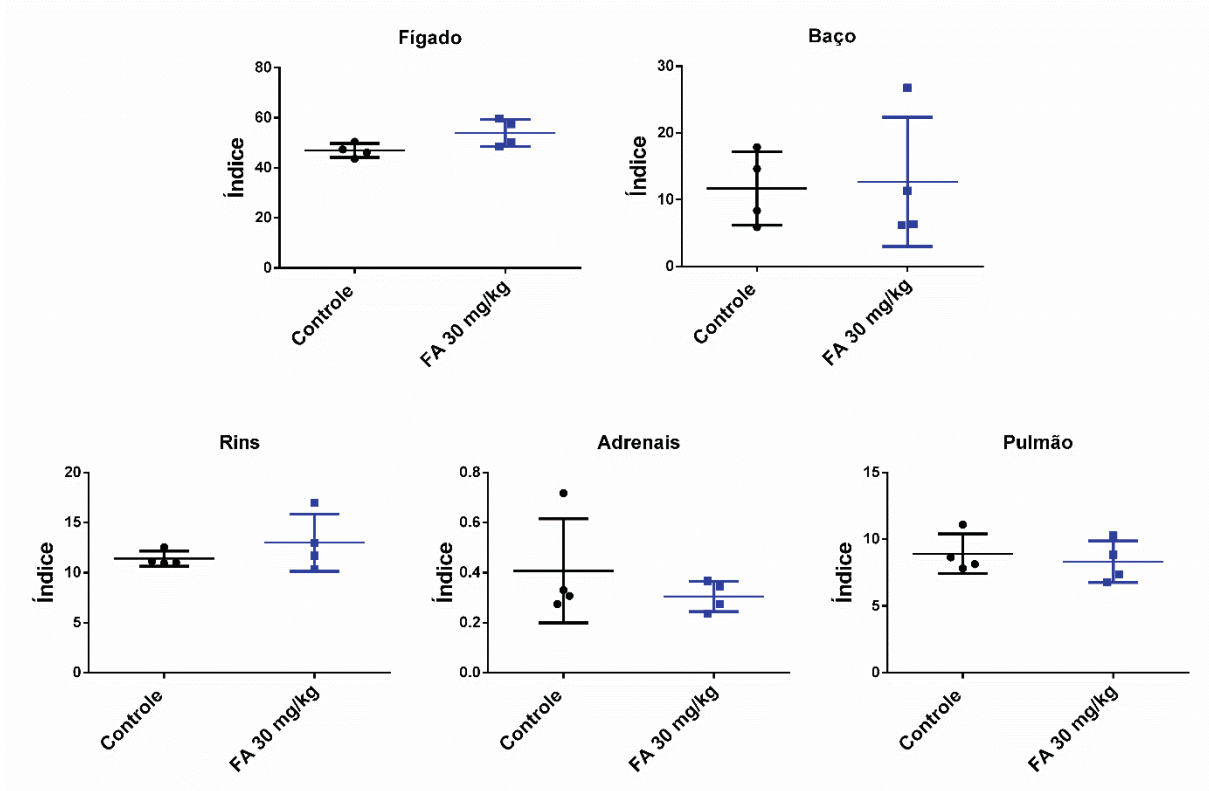
LEGENDA: **A** – Curva de crescimento exponencial calculado a partir das médias por grupo evidenciando a diferença entre os tratamentos. **B** – Tempo de dobramento, isto é, o tempo necessário para que os tumores dobrem o seu volume (em dias). Os tumores do grupo tratado preventivamente com 30mg/kg de fucana A apresentaram um tempo de dobramento significativamente maior do que os tumores do grupo controle ($p < 0,05$). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

Como o tratamento preventivo com a dose de 30mg/kg de fucana A, foi eficaz em inibir o crescimento dos tumores sólidos, verificou-se possíveis efeitos adversos através dos seguintes parâmetros fisiológicos: índice de peso de órgãos, perfil hematológico e perfil bioquímico.

4.2.2 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre os parâmetros fisiológicos em camundongos

Em relação ao peso dos órgãos não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo de tratado preventivamente com 30 mg/kg de fucana A ($p > 0,05$), avaliados através do índice de peso dos órgãos (gráfico 11).

GRÁFICO 11 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS NO MODELO DE TUMOR SÓLIDO

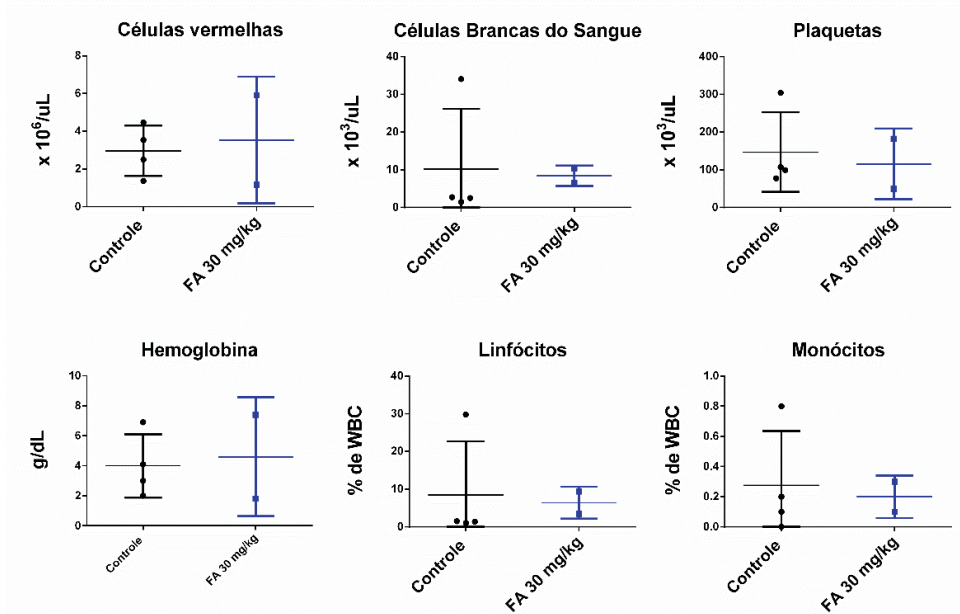


FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão para o índice de peso dos órgãos coletados em mg/g. Não foi observada diferença estatística entre controles e tratados ($p > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

Os perfis, hematológico (gráfico 12) e bioquímico (gráfico 13) do grupo tratado preventivamente com 30mg/kg de fucana A, também não apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros analisados no controle ($p > 0,05$).

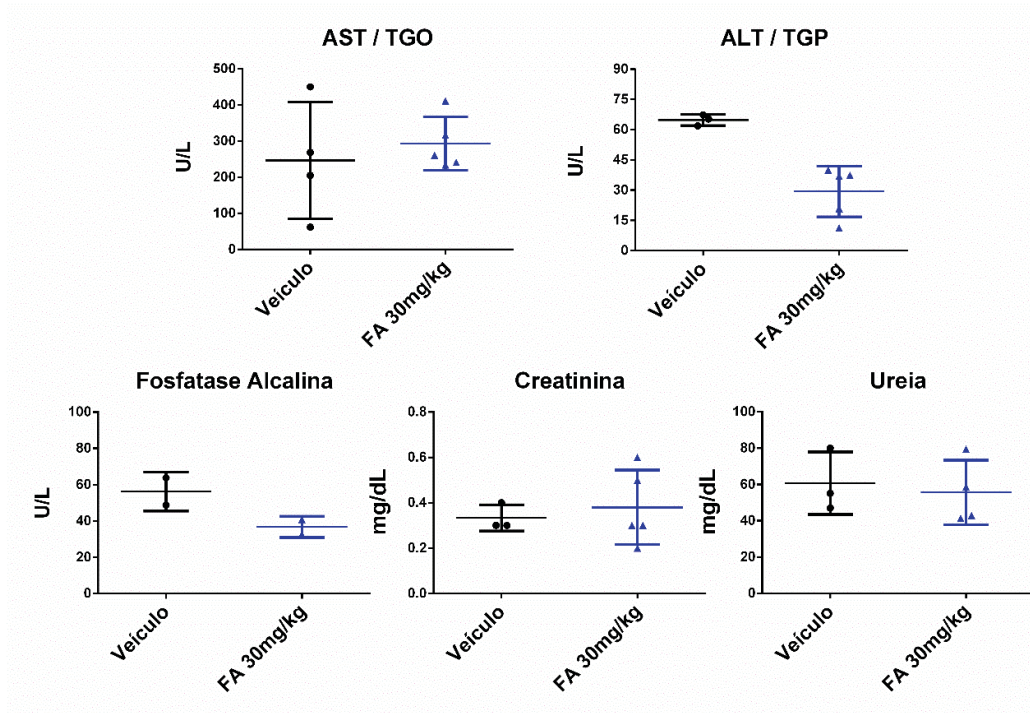
GRÁFICO 12 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL HEMATOLÓGICO NO MODELO DE TUMOR SÓLIDO



FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão. Não foi observada diferença estatística entre controles e tratados ($p > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

GRÁFICO 13 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM A DOSE DE 30 mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO NO MODELO DE TUMOR SÓLIDO



FONTE: O Autor (2018)

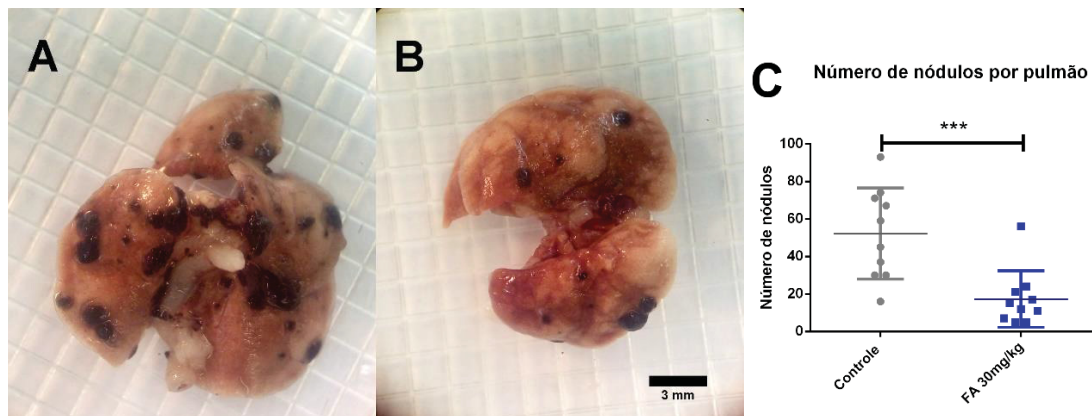
LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão. Não foi observada diferença estatística entre controles e tratados ($p > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

4.2.3 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre o modelo colonização ou metástase pulmonar

O tratamento preventivo foi iniciado 48h antes da inoculação das células da linhagem B16F10 (adaptado de GOMES, *et al.*, 2015; OVERWIJK e RESTIFO, 2001), utilizando a dose de 30 mg/kg de fucana A.

Ao final do experimento, conforme ilustrado na figura 10, o tratamento com fucana A resultou em uma redução significativa ($p < 0,001$) no número de nódulos tumorais no pulmão, sendo de 52,2 nódulos ($\pm 24,35$) no grupo controle, para 17,3 nódulos ($\pm 15,05$) nos animais tratados, o que corresponde a uma redução de 66,86%.

FIGURA 10 – FUCANA A LEVA A UMA REDUÇÃO DA QUANTIDADE DE NÓDULOS PULMONARES



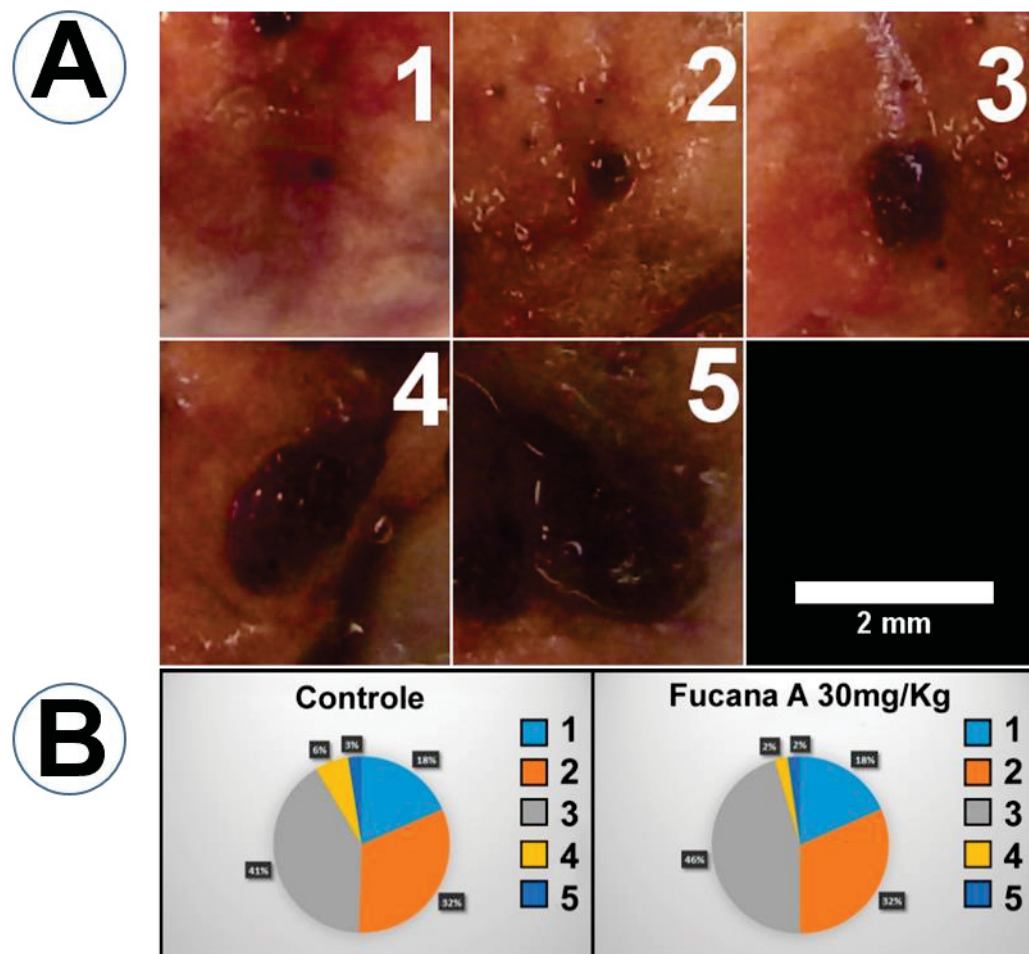
FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: A figura acima ilustra o efeito de fucana A sobre o desenvolvimento/implantação de nódulos pulmonares, num modelo de metástase experimental. Para tanto, células B16F10 foram inoculadas pela veia caudal em camundongos e o tratamento foi iniciado 48h antes da injeção, sendo que os animais tratados receberam solução contendo 30mg/kg de fucana A e o tratamento seguiu por mais 21 dias subsequentes. Ao final do ensaio (no 21º dia), os animais foram eutanasiados, sendo o pulmão dissecado. A e B - Observa-se pulmões com nódulos metastáticos de melanoma. A - Grupo controle. B - Grupo tratado com 30mg/kg de fucana A. C - Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão da contagem do número de nódulos em toda a superfície dos pulmões. Foi observada a redução significativa no número de nódulos implantados nos pulmões dos animais tratados com fucana A em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

Os dados mostram que houve uma menor quantidade de nódulos tumorais, quando os animais foram tratados com fucana A. No entanto, nota-se que tamanho dos nódulos tumorais não é homogêneo, apresentando nódulos grandes e outros bem pequenos. Assim, para entender se o tratamento interferiu no desenvolvimento dos nódulos, esses foram avaliados utilizando uma escala relativa de tamanho, que varia

de 1 até 5, onde 1 corresponde a nódulos pequenos e 5 corresponde aos maiores nódulos (figura 11A). Na análise visual, com o auxílio de um estereomicroscópio, observou-se que a variação, em porcentagem, nos tamanhos dos nódulos não difere entre o controle e o tratamento com 30mg/kg de fucana A (figura 11B).

FIGURA 11 – VARIÇÃO DO TAMANHO DOS NÓDULOS TUMORAIS



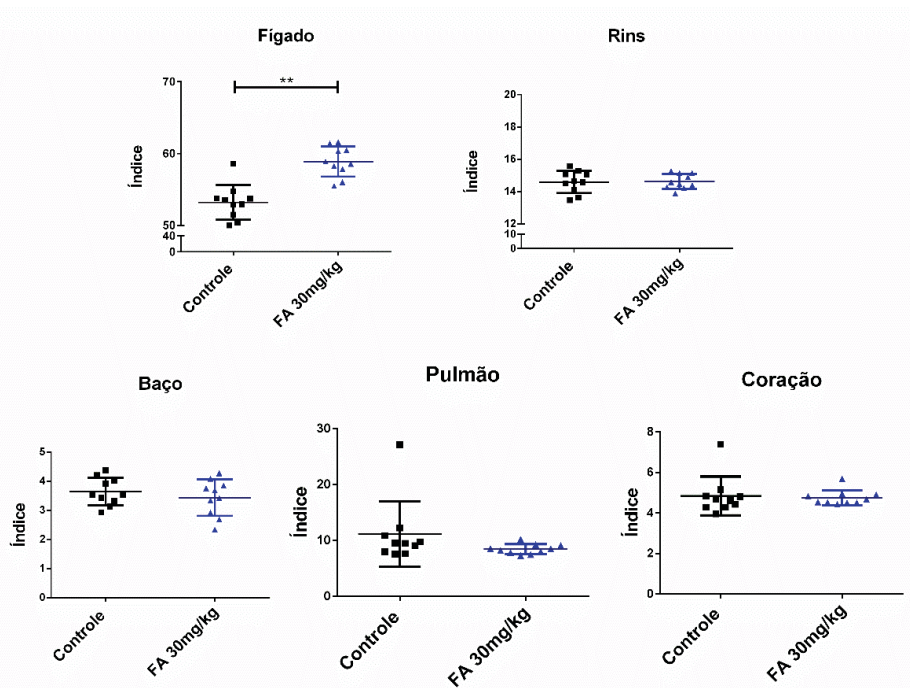
FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Não foi observada diferença entre a variação do tamanho dos nódulos implantados nos pulmões. **A** – Escala visual relativa da variação de tamanho de 1 a 5. **B** – Variação de tamanho dos nódulos observados em porcentagem do total de cada grupo.

4.2.4 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre os parâmetros fisiológicos em camundongos no modelo colonização ou metástase pulmonar

Em relação ao peso dos órgãos foi observada uma alteração significativa no índice de peso apenas no fígado dos animais tratados com 30mg/kg, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$). Contudo para os demais órgãos não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo de tratado preventivamente de fucana A, avaliados através do índice de peso dos órgãos (gráfico 14).

GRÁFICO 14 – EFEITO DO TRATAMENTO PREVENTIVO COM 30mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS NO MODELO DE METÁSTASE PULMONAR

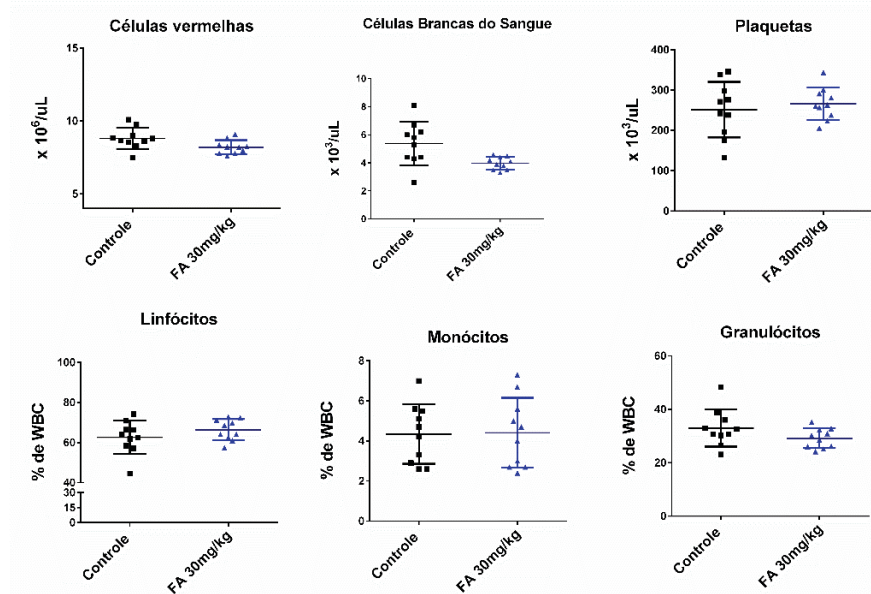


FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão para o índice de peso dos órgãos coletados em mg/g. Foi observado aumento do índice de peso do fígado dos animais tratados preventivamente com 30mg/kg de fucana A quando comparado aos animais controle ($p < 0,01$). Não foi observada diferença estatística entre controles e tratados para o índice dos demais órgãos analisados ($p > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

O perfil hematológico (gráfico 15) do grupo tratado preventivamente com 30 mg/kg de fucana A não apresentou diferença significativa em relação aos parâmetros analisados no controle ($p > 0,05$). Contudo, no perfil bioquímico pode-se notar que o tratamento com fucana A levou a uma redução significativa nos níveis séricos da fosfatase alcalina quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) (gráfico 16).

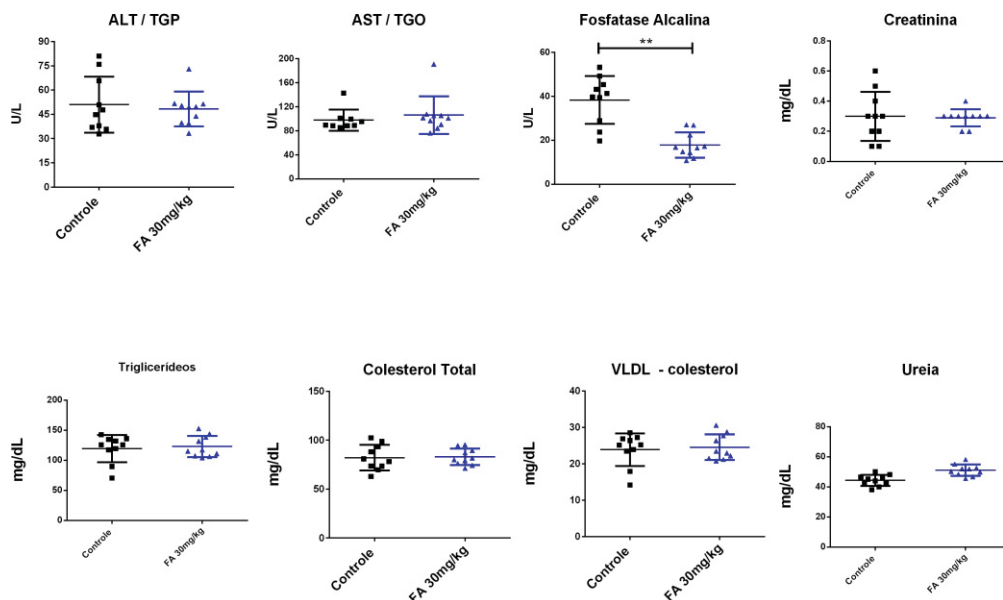
GRÁFICO 15 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM 30mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL HEMATOLÓGICO NO MODELO DE METÁSTASE PULMONAR



FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão. Não foi observada diferença estatística entre controles e tratados ($P > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

GRÁFICO 16 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM 30mg/Kg DE FUCANA A SOBRE O PERFIL BIOQUÍMICO NO MODELO DE METÁSTASE PULMONAR



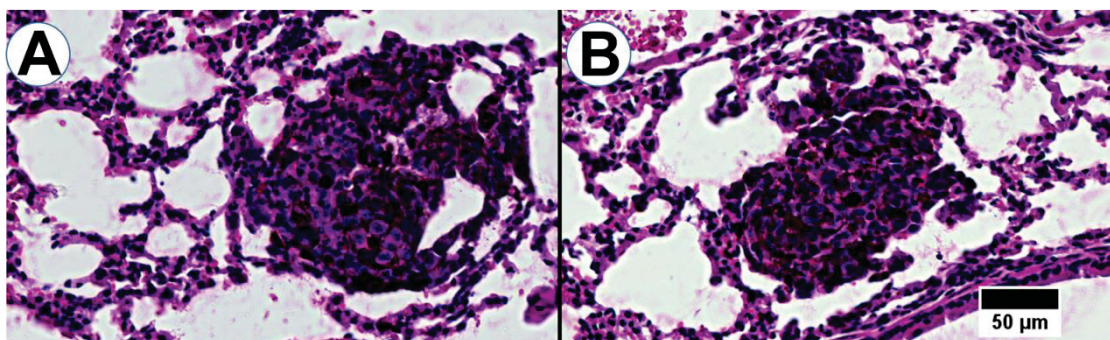
FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Gráfico de dispersão de pontos contendo média e desvio padrão. Foi observada uma redução significativa nos valores séricos de fosfatase alcalina ($p < 0,01$) nos animais tratados preventivamente com 30mg/kg de fucana A, quando comparada ao grupo controle. Não foi observada diferença estatística entre controles e tratados para os demais parâmetros analisados ($p > 0,05$). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

4.2.5 Efeito do tratamento preventivo da dose de 30mg/kg de fucana A sobre morfologia dos nódulos pulmonares

Para a avaliação morfológica dos tecidos, os cortes de pulmão com nódulos tumorais, foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.). Pode-se verificar na figura 12 a grande similaridade morfológica entre os nódulos implantados no tecido pulmonar.

FIGURA 12 – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NÓDULOS TUMORAIS NO TECIDO PULMONAR



FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: Imagem ilustrativa da avaliação histológica (corada com HE) onde pode-se verificar a similaridade entre o tamanho, ausência de áreas de morte, ausência de vasos intratumorais e presença de melanina dos nódulos tumorais. A – Controle. B – Tratado (30mg/kg de fucana A). FA = fucana A. A dose de 30 mg/kg de fucana A foi ministrada por via intraperitoneal a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais.

4.2.6 Discussão dos resultados dos tratamentos preventivos com fucana A

Quando a dose de 30mg/kg de fucana A foi administrada a partir de 48h antes da inoculação das células tumorais, e seguiu diariamente até a eutanásia, essa foi capaz de inibir o crescimento tumoral em 33,13%.

Com o tratamento preventivo, foi possível observar que a curva de crescimento tumoral do tratamento apresentou diferença significativa quando comparada com o controle, diferentemente do que foi observado com o tratamento terapêutico com a mesma dose de 30mg/kg. Calculando-se o tempo de dobramento pode-se observar que o tratamento com fucana A elevou o tempo necessário para o tumor dobrar de tamanho, o que produziu ao final do experimento tumores 33,13% menores em relação aos apresentados pelo grupo controle.

Jiang e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento preventivo com o polissacarídeo sulfatado denominado de ascophyllan, obtido da alga marinha *Ascophyllum nodosum*, também iniciado dois dias antes da inoculação das células tumorais, foi eficaz em inibir o crescimento de tumores sólidos de sarcoma-180. A administração de ascophyllan apresentou efeito biológico tanto por via oral como pela via intraperitoneal (JIANG, et al., 2014). Vale destacar que a fucana A, assim como o polissacarídeo ascophyllan, são obtidos de algas marrons (de diferentes gêneros). Ainda, assim como ascophyllan, fucana A também foi capaz de inibir do crescimento tumoral (fucana A em melanoma). Esses dados sugerem que o consumo alimentar de algas marinhas, e seus derivados, pode contribuir como uma estratégia complementar de tratamento de câncer, de modo preventivo.

Por outro lado, vale destacar que o modelo de tumor sólido, possui mais proximidade com o tumor primário e não tem relação com metástase. Mas os trabalhos de Santi (2015), embora *in vitro* indicam que a fucana A reduz a capacidade invasiva e perfil metastático de B16F10. Por isso, buscou-se avaliar também se a fucana A pode ter efeito em modelo de metástase pulmonar *in vivo*. Neste modelo, a dose de 30mg/kg de fucana A também foi capaz de reduzir em mais de dois terços a quantidade média de nódulos tumorais nos pulmões de animais.

A análise dos cortes histológicos dos pulmões de animais portadores de melanoma (pulmonar), mostrou que os nódulos presentes nos pulmões dos animais controles como nos tratados apresentam grande similaridade de tamanho e morfologia, isto é, a alteração foi apenas em quantidade, mas não no desenvolvimento dos nódulos pulmonares. Estes dados sugerem que a fucana A possivelmente esteja envolvida na fase de implantação das células no pulmão, dificultando a colonização do tecido, mas sem interferir no crescimento dos nódulos decorrentes das células que conseguiram se implantar neste órgão. Neste sentido, devido as características bioquímicas dos polissacarídeos sulfatados, como a fucana A e as fucoidanas, serem semelhantes à da heparina, é possível buscar indicações sobre os mecanismos de ação a serem estudados.

Neste sentido destaca-se os estudos sobre a atividade antimetastática da heparina, que está relacionada a sua capacidade de inibir a interação de moléculas de adesão celular com as P-selectinas, L-selectinas e integrinas. A interação das células tumorais presentes na circulação sanguínea com outros tipos celulares, como plaquetas, leucócitos e células endoteliais, é crucial para o estabelecimento de

nódulos metastáticos (BENDAS e BORSIG, 2012). A redução dessas interações leva a uma redução no número de nódulos pulmonares formados (GOMES, *et al.*, 2015). De forma similar, a fucana A também pode levar a menor implantação das células tumorais, uma vez que estando circulante, pode interagir com as moléculas adesivas presentes na superfície das células tumorais e, conseqüentemente, alteram sua capacidade de interação com o microambiente pulmonar, o que poderia explicar a menor implantação de nódulos tumorais. No entanto, esta hipótese permanece em aberto, devendo ser confirmada em ensaios futuros.

Com relação aos parâmetros fisiológicos, verificou-se alteração apenas no índice de peso do fígado dos animais tratados com fucana A quando comparado com o controle negativo. Vale destacar que só foi verificada alteração no peso do fígado nos animais que foram pré-tratados com fucana A e submetidos aos ensaios de metástase pulmonar, o que pode ser explicado, pois somente nesses ensaios houve um tratamento mais prologado, uma vez que foi iniciado 2 dias antes da inoculação e seguiu até a véspera da eutanásia, que neste caso aconteceu no 21º dia após a inoculação das células tumorais. Portanto, nesses ensaios, os animais foram tratados por 23 dias e nos ensaios de tumor sólido por 17 dias (também no caso de tratamento preventivo).

A alteração no peso do fígado dos animais tratados com fucana A poderia ser preocupante, mas deve-se considerar que, quando este órgão está comprometido por algum distúrbio ocorre um aumento na concentração plasmática total da fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina, segundo Rosalki e Foo (1984), possui importante valor diagnóstico estabelecido em doenças ósseas e hepáticas. No entanto, no presente trabalho não foi observada redução dos níveis séricos da fosfatase alcalina, o que mostra que o fígado dos animais tratados com fucana A, não estavam comprometidos.

Quando os dados fisiológicos e bioquímicos são avaliados em conjunto, nos dois modelos *in vivo* testados, indicam que a fucana A não produz alterações nocivas ao organismo dos animais tratados. Sendo assim, o presente trabalho mostra, de forma clara que a fucana A possui ação antimelanoma, o que sugere uma possível atuação como coadjuvante de quimioterápicos, podendo contribuir para um tratamento efetivo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos dados obtidos no presente trabalho sugere que a fucana A possui atividade antimelanoma, reduzindo o crescimento *in vivo* de tumores sólidos e a formação de metástases pulmonares de melanoma murino. A dose de fucana A que produziu este efeito terapêutico em tumores pré-estabelecidos foi de 100mg/kg, enquanto que a dose que produziu o efeito preventivo contra o surgimento de novos tumores e nódulos pulmonares foi de 30mg/kg.

Os tumores sólidos formados nos camundongos cresceram mais lentamente e apresentaram uma menor área de vasos sanguíneos quando os animais foram tratados com fucana A.

A fucana A não provocou alterações fisiológicas adversas, se mostrando segura para uso na terapia contra melanoma.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O mecanismo de ação pelo qual a fucana A atua sobre o melanoma ainda é desconhecido, e necessitam mais estudos para ser elucidado. Para futuros trabalhos sugerem-se:

- Investigar a ação da fucana A sobre o ciclo celular de B16F10;
- Avaliar marcadores, e fatores de crescimento relacionados à angiogênese;
- Avaliar a interação da fucana A com moléculas de adesão, especialmente selectinas e integrinas.
- Avaliar a se a fucana A possui efeito adjuvante à outras terapias anticâncer.

REFERÊNCIAS

- ACS - American Cancer Society. Melanoma Skin Cancer. Atlanta, Ga: **American Cancer Society**; 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/index/>> Acesso em: 05/04/2016
- ACS - American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta: **American Cancer Society**; 2016
- ALE, M. T.; MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, n. 3, p. 331–336, 2011. **Elsevier** B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.05.009>>
- AFRATIS, N. A., KARAMANOU, K., PIPERIGKOU, Z., VYNIOS, D. H., THEOCHARIS, A. D. The role of heparins and nano-heparins as therapeutic tool in breast cancer. **Glycoconjugate Journal**, p. 1-9, 2016
- ATASHRAZM, F.; LOWENTHAL, R. M.; WOODS, G. M.; HOLLOWAY, A. F.; DICKINSON, J. L. Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 2327–2346, 2015
- AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE (AIHW). Cancer in Australia 2017. Canberra: **Cancer series** N. 101. 2017. Disponível em: <<https://www.aihw.gov.au/reports/cancer/cancer-in-australia-2017/contents/table-of-contents>> Acesso em: 19/08/18
- BANDARCHI, B.; JABBARI, C.A.; VEDADI, A.; NAVAB, R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **J Clin Pathol**. V. 66, p. 644–648. 2013
- BARROSO, E. M.; COSTA, L. S.; MEDEIROS, V. P.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S.; FRANCO, C. R.; NADER, H. B.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. A non-anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity in vivo. **Planta medica**, v.74, p.712-718. 2008
- BATOOL, T., FANG, J., BARASH, U., MOUSTAKAS, A., VLODAVSKY, I., LI, J. P. Overexpression of heparanase attenuated TGF- β -stimulated signaling in tumor cells. **FEBS Open Bio**. v.7, p.405-413. 2017
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1825, n.1, p.29-36, 2012
- BENDAS, G.; BORSIG, L. Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, 2012
- BISCAIA, S. M.P.; CARBONERO, E. R.; BELLAN, D. L.; BORGES, B. S.; COSTA, C. R.; ROSSI, G. R.; GONÇALVES, J. P.; MELO, C. M.; LÍVERO, F. A.R.; RUTHES, A.

C.; ZOTZ, R.; SILVA, E. V.; OLIVEIRA, C. C.; ACCO, A.; NADER, H. B.; CHAMMAS, R.; IACOMINI, M.; FRANCO, C. R.C.; TRINDADE, E. S. Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, n. August, p. 95–104, 2017. Elsevier. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.117>>

BISHOP, D. T., DEMENAS, F., GOLDSTEIN, A. M., BERGMAN, W., BISHOP, J. N., BRESSAC-DE PAILLERETS, B., CHOMPRET, A., GHIORZO, P., GRUIS, N., HANSSON, J., HARLAND, M., HAYWARD, N., HOLLAND, E.A., MANN, G.J., MANTELLI, M., NANCARROW, D., PLATZ, A., TUCKER, M.A., Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 12, p. 894-903, 2002

BOBEK, V.; BOUBELIK, M.; FIŠEROVÁ, A.; L'UPTOVCOVA, M.; VANNUCCI, L.; KACPRZAK, G.; KOLODZEJB, J.; MAJEWSKIB, A.M.; HOFFMANE, R.M. Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. **Lung Cancer**, v. 47, n. 2, p. 215-223, 2005

BOWYER, S., PRITHVIRAJ, P., LORIGAN, P., LARKIN, J., MCARTHUR, G., ATKINSON, V., MILLWARD, M., KHOU, M., DIEM, S., RAMANUJAM, S., KONG, B., LINIKER, E., GUMINSKI, A., PARENTE, P., ANDREWS, M.C., PARAKH, S., CEBON, J., LONG, G.V., CARLINO, M.S., KLEIN, O. Efficacy and toxicity of treatment with the anti-CTLA-4 antibody ipilimumab in patients with metastatic melanoma after prior anti-PD-1 therapy. **British journal of cancer**, v. 114, p. 1084-1089, 2016

BRANDNER, J. M.; HAASS, N. K.; Melanoma's connections to the tumour microenvironment. **Pathology** v.45, p. 443–452. 2013

BURNEY, M.; MATHEW, L.; GAIKWAD, A.; et al. Evaluation Fucoidan Extracts From *Undaria pinnatifida* and *Fucus vesiculosus* in Combination With Anticancer Drugs in Human Cancer Orthotopic Mouse Models. **Integrative Cancer Therapies**, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1534735417740631>>

CHANG, Y. M. ; BARRETT, J.H. ; BISHOP, D.T.; ARMSTRONG, B.K.; BATAI, V.; BERGMAN, W.; BERWICK, M.; BRACCI, P.M.; ELWOOD, J.M.; ERNSTOFF, M.S.; GALLAGHER, R.P.; GREEN, A.C.; GRUIS, N.A.; HOLLY, E.A.; INGVAR; C.; KANETSKY, P.A.; KARAGAS, M.R.; LEE, T.K.; MARCHAND, L.L.; MACKIE, R.M.; OLSSON, H.; ØSTERLIND, A.; REBBECK, T. R.; SASIENI,P.; SISKIND, V.; SWERDLOW, A.J.; TITUS-ERNSTOFF, L.; ZENS, M.S.; NEWTON-BISHOP, J. A. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. **Int. J. Epidemiol.** v. 38, p. 814-30. 2009

CHAPMAN, P.B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C.; HAANEN, J.B.; ASCIERTO, P.; LARKIN, J.; DUMMER, R.; GARBE, C.; TESTORI, A.; MAIO, M.; HOGG, D.; LORIGAN, P.; LEBBE, C.; JOUARY, T.; SCHADENDORF, D.; RIBAS, A.; O'DAY, S.J.; SOSMAN, J.A.; KIRKWOOD, J.M.; EGGERMONT, A.M.M.; DRENO, B.; NOLOP, K.; LI, J.; NELSON, B.; HOU, J.; LEE, R.J.; FLAHERTY, K.T.; MCARTHUR, G.A. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 2507–2516. 2011

CLARK, W.H. JR; ELDER, D.E.; GUERRY, D; EPSTEIN, M.N.; GREENE, M.H.; VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum. Pathol.** v.15, p. 1147-1165. 1984

CLAYTON, J. A., COLLINS, F. S. NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, v. 509, p. 282-3, 2014

DE AGUIAR, R. B.; PARISE, C. B.; SOUZA, C. R.; BRAGGION, C.; QUINTILIO, W.; MORO, A.M.; MARQUES, F. L.; BUCHPIGUEL, C. A.; CHAMMAS, R.; DE MORAES, J. Z. Blocking FGF2 with a new specific monoclonal antibody impairs angiogenesis and experimental metastatic melanoma, suggesting a potential role in adjuvant settings. **Cancer Letters (Print)**, v. 371, p. 151-160, 2016

DYE, E. D.; MEDIC, S.; ZIMAN, M.; COOMBE, D. R. Melanoma Biomolecules: Independently Identified but Functionally Intertwined. *Front Oncol*, v. 3, p. 1-17, 2013.
ELDER, D.E. Melanoma progression. **Pathology** v. 48, p. 147–154. 2016

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, p. 795-803. 2002

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LeCOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**. v.9 p. 669 – 676. 2003

FERRARI DE ANDRADE, L.; MOZELESKI, B.; LECK, A.R.; ROSSI, G.; COSTA, C.R.V.; GUIMARÃES, F.S.F.; ZOTZ, R.; NASCIMENTO, K.F.; OLIVEIRA, C.C.; BUCHI, D.F.; TRINDADE, E.S. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. **Homeopathy**. v. 105, p. 109-118. 2016

FERREIRA, V.H.C. **Avaliação da Atividade Biológica de Polissacarídeos Sulfatados sobre modelo de Melanoma Murino**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012

FITTON, J. H.; STRINGER, D. N.; KARPINIEC, S. S. Therapies from fucoidan: An update. **Marine Drugs**, v. 13, n. 9, p. 5920–5946, 2015

FRANCO, O. E.; SHAWB, A. K.; STRANDA, D. W.; HAYWARD, S. W. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, p. 33–39, 2010

FUKUTA, K.; NAKAMURA, T., Induction of hepatocyte growth factor by fucoidan and fucoidan-derived oligosaccharides. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 499-503, 2008

GANDHI, N.S.; MANCERA, R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chem Biol & Drug Des**, v. 72, p. 455-82. 2008

GOMES, A. M.; KOZLOWSKI, E. O.; BORSIG, L.; 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, 2015

HAASS, N. K., SMALLEY, K. S.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Res**, v. 18, p. 150-9. 2005

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, p. 309-322. 2012

HARRIES, M.; MALVEHY, J.; LEBBE, C.; HERON, L.; AMELIO, J.; SZABO, Z.; SCHADENDORF, D. Treatment patterns of advanced malignant melanoma (stage III-IV) - A review of current standards in Europe. **Eur J Cancer**. 2016

HODI, F.; O'DAY, S.; MCDERMOTT, D. F.; WEBER, R. W.; SOSMAN, J. A.; HAANEN, J. B.; GONZALEZ, R.; ROBERT, C.; SCHADENDORF, D.; HASSEL, J. C.; AKERLEY, W.; VAN DEN EERTWEGH, A. J. M.; LUTZKY, J.; LORIGAN, P.; VAUBEL, J. M.; LINETTE, G. P.; HOGG, D.; OTTENSMEIER, C. H.; LEBBÉ, C.; PESCHEL, C.; QUIRT, I.; CLARK, J. I.; WOLCHOK, J. D.; WEBER, J. S.; TIAN, J.; YELLIN, M. J.; NICHOL, G. M.; HOOS, A.; URBA, W. J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, p.711-723. 2010

HODIS, E., WATSON, I. R., KRYUKOV, G. V., AROLD, S. T., IMIELINSKI, M., THEURILLAT, J. P., NICKERSON, E., AUCLAIR, D., LI, L., PLACE, C., DICARA, D., RAMOS, A. H., LAWRENCE, M.S., CIBULSKIS, K., SIVACHENKO, A., VOET, D., SAKSENA, G., STRANSKY, N., ONOFRIO, R.C., WINCKLER, W., ARDLIE, K., WAGLE, N., WARGO, J., CHONG, K., MORTON, D.L., STEMKE-HALE, K., CHEN, G., NOBLE, M., MEYERSON, M., LADBURY, J.E., DAVIES, M.A., GERSHENWALD, J.E., WAGNER, S.N., HOON, D.S.B., SCHADENDORF, D., LANDER, E.S., GABRIEL, S.B., GETZ, G., GARRAWAY, L.A., CHIN, L. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell**, v. 150, p. 251-263, 2012

HOFMANN, U.B.; HOUBEN, R.; BRÖCKER, E.B.; BECKER, J.C. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie*, v.87, p.307-314; 2005.
HOUGHTON, A. N e POLSKY, D. Focus on melanoma. **Cancer Cell**, v. 2, p. 275-8; 2002

HSU, M.Y.; ANDL, T.; LI, G.; MEINKOTH, J. L.; HERLYN, M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. **Journal of Cell Science**. v.113, p. 1535-1542. 2000a

HSU, M.Y., MEIER, F.E., NESBIT, M., HSU, J.Y., VAN BELLE, P., ELDER, D.E., AND HERLYN, M. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. **American Journal of Pathology**, v. 156, p.1515–1525. 2000b.

IKUSHIMA, S., ONO, R., FUKUDA, K., SAKAYORI, M., AWANO, N., & KONDO, K. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. **Japanese journal of clinical oncology**, v. 46, p. 204-208, 2016

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>> Acesso em: 22/03/16.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>> Acesso em: 15/04/18.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **GLOBOCAN 2012**: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>> Acesso em 06/04/2016.

IOZZO, R. V. e SANDERSON, R. D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 15, n. 5, p. 1013-1031, 2011

JIANG, Z.; ABU, R.; ISAKA, S.; NAKAZONO, S.; UENO, M.; OKIMURA, T.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Inhibitory effect of orally-administered sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from ascophyllum nodosum on the growth of sarcoma-180 solid tumor in mice. **Anticancer research**. v.34, p.1663-1672. 2014

Jour, G.; Ivan, D.; Aung, P. P. Angiogenesis in melanoma: an update with a focus on current targeted therapies. **J Clin Pathol Published**. v. 0, p. 1–12. 2016

KATOH, M. FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 38, p. 3-15, 2016

LEE, D. Y.; LEE, S. W.; KIM, S. K.; et al. Antiangiogenic activity of orally absorbable heparin derivative in different types of cancer cells. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 12, p. 2667–2676, 2009

LEITE, E. L., MEDEIROS, M. G., ROCHA, H. A., FARIAS, G. G., DA SILVA, L. F., CHAVANTE, S. F., DE ABREU, L. D., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant science**, v. 132, p. 215-228, 1998

MARAVEYAS A.; JOHNSON M.J.; XIAO Y.P.; NOBLE S. Malignant melanoma as a target malignancy for the study of the anti-metastatic properties of the heparins. **Cancer Metastasis Rev**. v. 29, p. 777-84. 2010

MATOS, A.; FRANCISCO, A. Targets, Structures, and Recent Approaches in Malignant Melanoma Chemotherapy. **ChemMedChem**. v.8, p.1751-1765. 2013.
MOUSA, S.A. e MOHAMED, S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. **Thromb Haemost**. v. 92, p. 627-33. 2004

NIKITOVIC, D.; MYTILINAIYOU, M.; BERDIAKI, A.; KARAMANOS, N. K.; TZANAKAKIS, G.N. Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, n.8, p.2471-2481, 2014.

O'CONNELL, M.P.; WEERARATNA, A.T. A spoonful of sugar makes the melanoma go: the role of heparan sulfate proteoglycans in melanoma metastasis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v.22, p.724-39, 2011

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a mouse model for human melanoma. **Current Protocols in Immunology**, p. 20.1. 1-20.1. 29, 2001

PARK, H.; KIM, G.-Y.; MOON, S.-K.; et al. Fucoidan Inhibits the Proliferation of Human Urinary Bladder Cancer T24 Cells by Blocking Cell Cycle Progression and Inducing Apoptosis. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5981–5998, 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/19/5/5981>>.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer** v. 15, p. 540–555. 2015

PRESTA, M.; DELL'ERA, P.; MITOLA, S.; MORONI, E.; RONCA, R.; RUSNATI, M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v.16, p. 159–178. 2005

PRYDZ, K. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. **Biomolecules**, v. 5, p. 2003-2022, 2015

ROCHA, H.A.O.; COSTA, L.S.; LEITE, E.L. structural and biological insights into antitumor seaweed sulfated polysaccharides. In: POMIN, V.H. (Ed.) Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses. New York: **Nova Science Publishers Inc**, 2011. p. 221-232

ROCHA, H.A.O.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; CARVALHO, L.C.M.; VEIGA, S.S.; LEITE, E.L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 34, p. 621-626. 2001

ROSALKI, S. B.; FOO, A. Y. Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. **Clinical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1182–1186, 1984.

SANTI, F.C. **Avaliação das alterações moleculares causadas por polissacarídeos sulfatados em modelo de melanoma *in vitro***. 97p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SHAIN, A. H., YEH, I., KOVALYSHYN, I., SRIHARAN, A., TALEVICH, E., GAGNON, A., DUMMER, R., NORTH, J., PINCUS, L., RUBEN, B., RICKABY, W., D'ARRIGO, C., ROBSON, A., BASTIAN, B. C. RICKABY, W. The genetic evolution of melanoma

from precursor lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1926-1936, 2015

SHAVERDASHVILI, K.; WONG, P.; MA, J.; ZHANG, K.; OSMAN, I.; BEDOGNI, B. MT1-MMP modulates melanoma cell dissemination and metastasis through activation of MMP2 and RAC1. *Pigment Cell Melanoma Res.* v. 27, p. 287–96. 2014
 SCHADENDORF, D.; FISHER, D.E.; GARBE, C.; GERSHENWA, J.E.; GROB, J.J.; HALPERN, A.; HERLYN, M.; MARCH, M.A.; MCARTHUR, G.; RIBAS, A.; ROESCH, A.; HAUSCHILD, A. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 1, p. 1-20. 2015

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V.; LONGAIR, M.; PIETZSCH, T.; PREIBISCH, S.; RUEDEN, C.; SAALFELD, S.; SCHMID, B.; TINEVEZ, J.Y.; WHITE, D.J.; HARTENSTEIN, V.; ELICEIRI, K.; TOMANCAK, P.; CARDONA, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, p. 676-682, 2012

SEEBODE, C.; LEHMANN, J.; EMMERT, S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies. **Anticancer Research** v. 36, p. 1371-1378. 2016.

SENTHILKUMAR, K., MANIVASAGAN, P., VENKATESAN, J., & KIM, S. K. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International journal of biological macromolecules*, v. 60, p. 366-374, 2013
 SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A.; Cancer statistics, 2016. CA: A **Cancer Journal for Clinicians**. v.66, p. 7–30. 2016.

SOSMAN, J. A., KIM, K. B., SCHUCHTER, L., GONZALEZ, R., PAVLICK, A. C., WEBER, J. S., MCARTHUR, G.A., HUTSON, T. E., MOSCHOS, S.J., FLAHERTY, K. T., HERSEY, P., KEFFORD, R., LAWRENCE, D., PUZANOV, I., LEWIS, K.D., AMARAVADI, R.K., CHMIELOWSKI, B., LAWRENCE, J., SHYR, Y., YE, F., LI, J., NOLOP, K.B., LEE, R.J., ANDREW K. JOE, A.K., RIBAS, A. Survival in BRAF V600–mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. **N engl J med**, v. 2012, p. 707-714, 2012

TANG, X.; HUANG, J.; XIONG, H.; ZHANG, K.; CHEN, C.; WEI, X.; XU, X.; XIE, Q.; HUANG, R. Anti-Tumor Effects of the Polysaccharide Isolated from *Tarphochlamys Affinis* in H22 Tumor-Bearing Mice. **Cell Physiol Biochem**. v.39, p.1040-1050. 2016.

VOELCKER, V.; GEBHARDT, C.; AVERBECK, M.; SAALBACH, A.; et al. Hyaluronan Fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signaling via TLR4. **Experimental Dermatology**, v.17, p. 100-107, 2008.

VULTUR, A.; HERLYN, M. SnapShot: melanoma. **Cancer cell**, v. 23, p. 706-706, 2013.

WAGNER, J.D.; GORDON, M.S.; CHUANG, T.Y.; COLEMAN, J.J. Current therapy of cutaneous melanoma. **Plast Reconstr Surg**. v. 105, p. 1774-99. 2000

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em:
<<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>> Acesso em: 06/04/2016.

XING, F., SAIDOU, J., WATABE, K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 15, p. 166, 2010

XUE, M.; GE, Y.; ZHANG, J.; WANG, Q.; HOU, L.; LIU, Y.; SUN, L.; LI, Q. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer in vitro and in vivo. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e43483, 2012.

YOON, M.; CAMPBELL, J. L.; ANDERSEN, M. E.; CLEWELL, H. J. Quantitative in vitro to in vivo extrapolation of cell-based toxicity assay results. **Critical Reviews in Toxicology**, v.42, p.633–652, 2012

ZBYTEK, B.; CARLSON, J.A.; GRANESE, J.; ROSS, J.; MIHM, M.; SLOMINSKI†, A. Current concepts of metastasis in melanoma. **Expert Rev. Dermatol.** v. 3, p. 569–585. 2008.

ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA-UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 991

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.140302/2016-17

APROVADO/APPROVAL: 06/07/2016 – R.O. 06/2016

TÍTULO: Avaliação da ação antitumoral *in vivo* da xilofucoglucuronana (fucana A) em modelo de melanoma murino.

TITLE: Antitumor activity *in vivo* of xylofucoglucuronana (fucan A) in murine model.

AUTORES/AUTHORS: Edvaldo Silva Trindade, Israel Henrique Bini, Gustavo Rodrigues Rossi, Stelée Marcela Petris Biscaia.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular


 Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
 Coordenadora da CEUA

ANEXO 2 – CERIFICADO CEUA-FMUSP



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL IN VIVO DA XILOFUCOGLUCURONANA, (FUCANA A) EM MODELO DE MELANOMA MURINO**”, registrada com o nº **092/17**, sob a responsabilidade de **Roger Chammas** e **Israel Henrique Bini**, apresentada pelo ICESP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 05.07.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 20-07-2017 Término: 30-08-2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	69
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 05 de Julho de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais