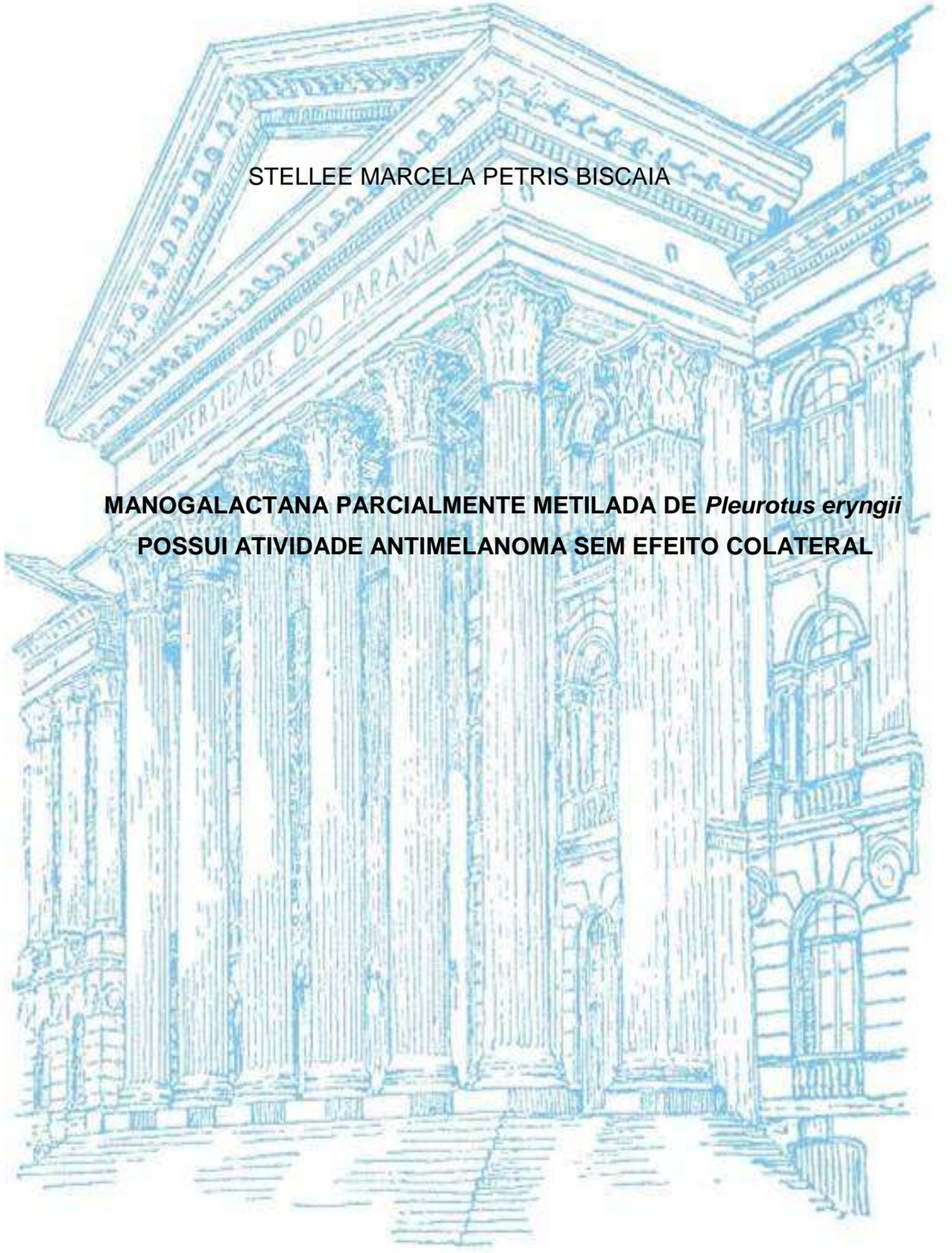


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STELLE MARCELA PETRIS BISCAIA

**MANOGALACTANA PARCIALMENTE METILADA DE *Pleurotus eryngii*
POSSUI ATIVIDADE ANTIMELANOMA SEM EFEITO COLATERAL**



CURITIBA
2016

STELLEE MARCELA PETRIS BISCAIA

**MANOGALACTANA PARCIALMENTE METILADA DE *Pleurotus eryngii*
POSSUI ATIVIDADE ANTIMELANOMA SEM EFEITO COLATERAL**

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA
2016

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Stellee Marcela Petris Biscaia**, no dia 29 de Novembro de 2016, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFPR) defendeu sua Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "Manogalactana parcialmente metilada de *Pleurotus eryngii* possui atividade antimelanoma sem efeito colateral", com a banca examinadora composta pelos Profs. Drs. Adriana Frohlich Mercadante (Universidade Federal do Paraná - UFPR), Carla Abdo Brohen (Grupo o Boticário), Michel Fleith Otuki (Universidade Federal do Paraná – UFPR), Andrea Senff Ribeiro (Universidade Federal do Paraná - UFPR), e Célia Regina Cavichiolo Franco (Orientadora e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná), e foi Aprovada.

A solicitação de emissão do Diploma de Doutor em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta declaração tem validade de 60 (sessenta) dias.



Curitiba, 29 de Novembro de 2016


Prof.ª Dr.ª Andrea Senff Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 200261

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

DEDICATÓRIA

Ao meu marido *Lúcio Régis Raysel Biscaia*, por me incentivar em todos os momentos e por partilhar comigo deste sonho até então impossível. Obrigada meu amor por todo apoio, compreensão e principalmente pela sua paciência e companheirismo, sempre me incentivando a prosseguir. Obrigada por compreender minha ausência em muitos momentos desses anos. Amo você!

A minha filha *Marcela Petris Raysel Biscaia*, pelo seu apoio e torcida, sempre com palavras de orgulho e compreensão, obrigada pelos seus beijos e abraços que acalmam o coração e renovam as energias, por todos os bilhetes de amor, por compreender e apoiar o sonho da mãe, mesmo que para isso tivéssemos que ficar distantes fisicamente por algum tempo, mas juntas pra sempre no coração. Você é minha vida!

Aos meus pais *José Luiz Petris e Maria W. Petris*, pelo amor, apoio incalculável, pelos ensinamentos que me fizeram chegar até aqui, por fazerem de mim quem sou hoje, por compreenderem minha ausência e por cuidarem da Marcela e do Lúcio, para que meu coração estivesse mais calmo no trabalho. Obrigada por sempre acreditarem em mim e estarem de braços abertos. Sua estrelinha ama muito vocês!

Aos meus pais de coração, meus sogros, *João Luiz Rodrigues Biscaia e Ilza A. Raysel Biscaia*, por partilharem do meu sonho, por toda a ajuda possível, pelas palavras de apoio, pelo carinho, por cuidarem do Lúcio e da Marcela enquanto eu estava ausente e por acreditarem em mim desde a graduação. Amo vocês!

Ao meu irmão *Johnny Fabiano Petris* e a minha cunhada *Elaine F. Vieira Petris*, por toda ajuda e amor, por compreenderem meu trabalho e por todo o cuidado com a Marcela e com nossos pais na minha ausência. Obrigada por existirem em minha vida!

Ao meu falecido nono Bernardino Petris e a todos os pacientes com câncer

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, pelas bênçãos de todos os dias e noites, pelo discernimento em fazer da minha pesquisa algo para o bem, me iluminando e proporcionando que a minha realização pessoal fosse atingida, colocando em meu caminho somente pessoas maravilhosas, tornando esse trabalho científico o mais proveitoso e satisfatório possível. Obrigada meu Deus pela força de cada dia.

A todos os meus familiares, pelo incentivo e compreensão. Obrigada por compreenderem minha ausência. Obrigada pela surpresa da despedida e da chegada, e ainda mais por todo o apoio enquanto estava tão longe, cada palavra e cada mensagem foi importante!

A minha mãe científica, minha orientadora, *Célia Regina Cavichiolo Franco*, sempre iluminando meu dia, com seu sorriso iluminador, com suas palavras de grandeza, por sempre acreditar em meu sonho e principalmente por sempre acreditar no meu trabalho. Obrigada pela oportunidade que me fez crescer e pelos ensinamentos científicos. Obrigada por tudo!

Ao meu pai científico, meu coorientador, *Edvaldo da Silva Trindade*, por todo o ensinamento científico e pelo apoio pessoal nos momentos mais difíceis. Obrigada pela sua disponibilidade, atenção, carinho e pelo seu profissionalismo. Obrigada por fazer os dias menos complicados e por acreditar em mim e no meu trabalho. Obrigada pela oportunidade. Você foi muito importante para esta realização.

Ao querido e competente *Professor Dr. Roger Chammas*, por todo o ensinamento, reuniões, discussões científicas, por todo o apoio, pelo exemplo de profissionalismo e competência em ser um pesquisador, e por acreditar em meu trabalho, abrindo as portas do seu laboratório e no exterior. Obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e pela oportunidade da convivência com seus alunos, sempre muito dedicados e competentes, em especial a *Camila*, *Adalberto* e *Tharcísio*, e a todos do ICESP-USP pela grandeza de ensinamentos.

Ao Professor Dr. Marcelo Iacomini e Professora Dr^a. Elaine Carbonero, por confiarem em meu trabalho, cedendo o polissacarídeo utilizado nessa tese, acreditando e se dedicando em nossa colaboração e compartilhando do nosso sonho.

Ao renomado Dr. Robert Gillies e a sua querida esposa Christine, que após uma bela e longa conversa no congresso, acreditou em meu trabalho e abriu as portas de seu laboratório e do grande Moffitt Cancer Center (Tampa/Flórida/USA). Obrigada pela competência, ensinamentos, passeios, por me tornar parte de sua família, pelas conversas, discussões científicas e por me ensinar o respeito e admiração ao seu país.

Ao Dr. Gary Martinez, meu coorientador americano, por todo ensinamento e dedicação, por todas as discussões e conversas agradáveis sobre cultura e equipamentos de imagem.

As minhas madrinhas científicas, Dorly de Freitas Buchi e Carolina Camargo de Oliveira, por todos os congressos, discussões, reuniões e aprendizados. Vocês foram muito importantes no meu crescimento profissional e pessoal nestes anos. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me apoiarem nas diversas vezes.

Aos meus queridos e amados colegas de laboratório da UFPR, os quais tornam essa jornada mais leve, obrigada por toda a dedicação e companheirismo, mostrando que um ambiente de trabalho pode sim ter harmonia e amor suficiente para nos tornar uma grande família. Obrigada a todos que passaram pela minha vida acadêmica e a todos que permanecem. Obrigada amigos do Laboratório LIPS (Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados) e do LCIN (Laboratório de Células Neoplásicas e Inflamatórias): Daniel, Gustavo, Jeniffer, Cleber, Ana, Fernanda, Gabriele, Isis, João, Maira, Mallu, Odair, Thiago, Vivi, Diogo, Lucas, Francine, Rafael, Victor, Simone, Aline, Raffaelo, Jerônimo, Tabata, Patricia, Kátia, Elisa, Diego, Eneida, Pablo e Israel.

Obrigada a todos os amigos do Moffitt, os quais se tornaram parte da minha família científica, em especial a minha “mãe” americana *Connie* e meu “pai” americano *David*, que me acolheram como filha em sua casa, bem como a toda a sua família e amigos que tornou os fins de semana mais alegres. Obrigada também aos amigos, em especial a *Dominique, Shonagh, Narges, Mehdi, Smitha, Bruna, Fábio, Rachel, Veronica, Michael, Alisson, Debbie, Epi, Willian, Asmaa, Nela, Mandi*. Obrigada por todas as festas comemorativas, feriados e por todos os gestos de carinho na minha despedida. Vocês permanecerão em meu coração.

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.

Aos colegas do Centro de Microscopia Confocal *Lis, Alessandra e Israel* por toda ajuda e profissionalismo.

As queridas secretárias *Marlene, Mirian, Claudia*, por sempre estarem dispostas a colaborar das mais variadas formas de ajuda possível.

As queridas ajudantes da limpeza obrigada pela colaboração e disposição em nos ajudar a deixar o ambiente mais agradável, sempre com sorrisos e conversas agradáveis.

A equipe de manutenção, por todo o apoio necessário em manter o laboratório o melhor possível, por todo o carinho e dedicação.

Ao seu *Luis* da portaria, pelo “bom dia” de todo dia, sempre com um sorriso no rosto, tornando meu início da manhã mais agradável.

Ao *Senhor Nino*, um exemplo de profissional competente, sempre disposto a nos ajudar com os microscópios, lâminas e colorações, mostrando a importância da sabedoria e competência.

A todos do biotério da UFPR, FMUSP, Moffitt e PUC-PR, pela ajuda com os animais, mostrando o carinho e competência, deixando o trabalho mais leve.

Aos *colegas pós-graduandos*, pela experiência na Representação Discente, pela oportunidade em aprender um pouco mais sobre o funcionamento da pós-graduação e pela oportunidade em representá-los, e pela oportunidade de aprender a realizar eventos de grande porte.

A CAPES e ao *CNPQ* pelo apoio financeiro e pela bolsa PDSE, que me deu a oportunidade em realizar o doutorado sanduíche.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

(Louis Pasteur, 1957)

RESUMO

Câncer é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada das células. O melanoma é o tipo de câncer de pele com menor incidência, mas de grande agressividade, o qual é originado por alterações em células chamadas melanócitos. O microambiente tumoral é muito importante para o desenvolvimento do melanoma, pois os melanócitos, queratinócitos e fibroblastos são células que contribuem para a progressão tumoral, através do depósito e remodelação da matriz extracelular (conjunto de proteínas e glicoconjugados), estimulando angiogênese, sobrevivência, diferenciação e motilidade celular. Muitas moléculas são importantes para a progressão tumoral: os proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs), integrinas, e enzimas de degradação. Compostos naturais vêm sendo estudados por sua atividade antitumoral, em especial polissacarídeos obtidos de cogumelos. Resultados obtidos anteriormente mostraram que um novo polissacarídeo, a manogalactana parcialmente metilada, denominada de P1, extraída do cogumelo *Pleurotus eringii*, em modelo *in vitro* de melanoma murino, não é citotóxico, mas reduziu a invasão celular. Tais resultados nos motivaram a avaliar, neste trabalho, o papel biológico deste polissacarídeo *in vitro* e seu efeito antitumoral em modelo *in vivo*, e efeitos colaterais. Os resultados deste trabalho, utilizando linhagem tumoral de melanoma murino (B16-F10) tratada com P1 ou não (controle) demonstraram que o P1 foi capaz de aumentar moléculas envolvidas na adesão celular como $\alpha_5\beta_1$, β_1 e talina, por imunomarcção. Através do ensaio de expressão gênica, demonstrou diminuição dos PGs sindecam-1 e perlecan, bem como da metaloprotease MMP-9, e da heparanase. Por outro lado, através de marcação metabólica, mostrou aumento dos proteoglicanos de heparan sulfato. Avaliou-se também o ácido hialurônico, GAG não sulfatado, o qual diminuiu a sua quantidade no extrato celular, por ELISA-like; e reduziu a expressão gênica das suas enzimas de síntese (HAS-2) e de degradação (Hialuronidase-1 e -2), bem como do seu receptor CD44, através de imunomarcção. Assim esses resultados se mostraram promissores, pois marcadores de progressão tumoral em melanoma foram suprimidos após tratamento com P1. Camundongos (C57BL/6) portadores de melanoma, tratados com P1 (50 mg/kg corporal), através de injeções intraperitoniais diárias (10 dias) foram empregados para se avaliar efeito antitumoral. Observou-se redução do volume tumoral de 60 % e regressão do tumor, por luminescência. Pode-se verificar que o efeito antitumoral não é dependente de osmolaridade, mas quando se associa P1 a um quimioterápico padrão (Dacarbazina) o efeito adjuvante se estabelece. Após as análises com camundongos *knockout* para galectina-3, pode-se verificar que esta lectina está envolvida no mecanismo de ação de P1. Além disso, não foi visualizado nenhum efeito colateral nos animais tratados com P1, através de análises de hemograma, perfil bioquímico, peso corporal e peso dos órgãos. Assim, os resultados mostram de forma evidente que o P1 tem ação antitumoral sobre melanoma, exercendo efeito adjuvante a Dacarbazina e sugerem que este efeito é via Galectina-3. Este composto mostrou-se promissor com ação antitumoral, não citotóxico, para o modelo de melanoma murino.

Palavras-chave: Melanoma; Polissacarídeo; *Pleurotus eryngii*; Manogalactana; Antitumoral; Efeito adjuvante a Dacarbazina; Sem efeito colateral; Galectina-3.

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell proliferation. Melanoma is a type of skin cancer with low incidence, but of great aggressiveness, that arise by changes in cells called melanocytes. The tumor microenvironment is very important for melanoma development, since melanocytes, keratinocytes and fibroblasts are cells that contribute for tumor progression through deposition and remodeling of extracellular matrix (proteins and glycoconjugates), promoting angiogenesis, survival, differentiation and cell motility. Many molecules are important for tumor progression: proteoglycans (PGs), glycosaminoglycans (GAGs), integrins, and degradation enzymes. Natural compounds are being studied for their antitumor activity, especially polysaccharides obtained from mushrooms. Results obtained previously showed that a new polysaccharide, a partially methylated mannogalactan, denominated P1, extracted from *Pleurotus eringii*, is not cytotoxic, but reduced cell invasion. These results motivated our group to evaluate the biological role of this polysaccharide *in vitro* and its antitumor effect in an *in vivo* model, as well as side effects. The present work, employing murine melanoma cell line (B16-F10) treated with P1 or not, showed that P1 was able to increase molecules involved in cell adhesion such as $\alpha_5\beta_1$, β_1 and talin, by immunolabeling. Gene expression assays demonstrated a decrease of syndecan-1 and perlecan PGs, MMP-9 metalloprotease and heparanase as well. However, metabolic labeling revealed an increase in heparan sulfate proteoglycans. Hyaluronic acid was also evaluated, a not sulfated GAG, which was decreased in cell extract, in ELISA-like assay; with a reduction in gene expression for both its synthesis and degradation enzymes (HAS-2, and Hyaluronidase-1 and -2, respectively). Immunolabeling assays also displayed a decrease in its receptor CD44. Thus, these results are promising, since tumor progression markers in melanoma were suppressed after P1 treatment. Mice injected subcutaneously with B16-F10 cells were treated with P1 (50 mg/kg body weight) by intraperitoneal injections daily (10 days) and were employed to evaluate antitumor effect. Reduction of 60% in tumor volume, and tumor regression were observed by luminescence. It was verified that the antitumor effect is not dependent on osmolarity. Nevertheless, when P1 is associated with a standard chemotherapeutic agent (Dacarbazine) the adjuvant effect is established. Analysis with knockout mice determined that lectin galectin-3 is involved in P1's mechanism of action. Additionally, no side effects were seen in P1 treated animals, through blood count, biochemical profile, body weight and organ weight. Thus, the results clearly show that P1 has antitumor action on melanoma, exerting an adjuvant effect with Dacarbazine and suggests that this effect is via Galectin-3. This compound proved to be promising with antitumor activity and non-cytotoxic action in murine melanoma model.

Keywords: Melanoma; Polysaccharide; *Pleurotus eringii*; Mannogalactan; Antitumor; Adjuvant effect on Dacarbazine; No side effect; Galectin-3.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Pele normal.....	17
FIGURA 2. Tipos de Câncer de pele..	18
FIGURA 3. O melanoma.....	19
FIGURA 4. Relação entre células da pele normal e do microambiente tumoral..	22
FIGURA 5. Estrutura de adesão da pele normal e do melanoma.).....	23
FIGURA 6. Ilustração da interação e coevolução entre fibroblastos do estroma, fibroblastos associados ao câncer (FACs) e melanoma.....	24
FIGURA 7. Interações das células hospedeiras tumorais no microambiente tumoral.....	24
FIGURA 8. Esquema de matriz extracelular, seus principais componentes e receptores de superfície celular.....	26
FIGURA 9. Síntese das funções da MEC.....	27
FIGURA 10. Estrutura de ligação dos GAGs nas proteínas formando os proteoglicanos.....	29
FIGURA 11. Classificação e representação esquemática de proteoglicanos.....	30
FIGURA 12. Classificação geral dos proteoglicanos (PGs).....	32
Figura 13. Diferentes formas de remodelação do PGHS.....	36
FIGURA 14. Regulação das funções de células tumorais por interações do ácido hialurônico (AH) e receptores.....	38
FIGURA 15. Estrutura e substratos de metaloproteases.....	42
FIGURA 16. MEC anormal estimula a progressão do câncer.....	43
FIGURA 17. Mecanismos de Inibição das MMPs pela RECK.....	45
FIGURA 18. Galectinas.....	47
FIGURA 19. Representação esquemática das funções da galectina-3 (Gal-3).....	47
FIGURA 20. Funções da galectina-3 no desenvolvimento tumoral associado à transformação e progressão tumoral.....	48
Figura 22. Avaliação da interferência do polissacarídeo P1 na invasão celular.....	50
Figura 23. Representação da estrutura química do polissacarídeo P1.....	51
Figura 24. Células B16-F10.....	53
FIGURA 25: Análise da migração celular após exposição ao P1.....	66
FIGURA 26. Análise por citometria de fluxo de integrina $\alpha_5\beta_1$, da subunidade β_1 de integrinas, bem como da proteínas acessória talina.....	68
FIGURA 27. Avaliação de proteoglicanos de heparam sulfato por qRT-PCR.....	70
FIGURA 28. Análise da expressão gênica de metaloproteases.....	72
Figura 29. Análise de heparam sulfato e de heparanase.....	74
FIGURA 32. Evolução tumoral após tratamento com o P1.....	80
FIGURA 33. Avaliação da evolução tumoral comparando P1 com um controle de osmolaridade.....	82
FIGURA 34. Avaliação do efeito antitumoral da DTI em relação ao efeito do P1.....	84
FIGURA 37. Hemograma dos camundongos portadores de melanoma.....	90
FIGURA 38. Perfil bioquímico dos camundongos tratados ou não com P1. Hemograma dos camundongos portadores de melanoma.....	92
FIGURA 39. Evolução tumoral em linhagens de camundongos deficientes de galectina-3.....	94
FIGURA 40. Comparação das linhagens de camundongo WT e GAL-3/KO quanto ao efeito do P1 em relação ao controle.....	95
FIGURA 40. Evolução tumoral em linhagem C57BL/6 GAL-3/KO.....	96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. OBJETIVO GERAL	13
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2. JUSTIFICATIVA	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. CÂNCER	15
3.1.1. CÂNCER DE PELE	17
3.1.2. MELANOMA	19
3.2. MICROAMBIENTE TUMORAL	21
3.2.1. MATRIZ EXTRACELULAR	25
3.2.2. GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS	28
3.2.3. INTEGRINAS	39
3.2.4. METALOPROTEASES	40
3.2.5. GALECTINAS	46
3.3. POLISSACARÍDEOS DE COGUMELOS COM ATIVIDADE BIOLÓGICA	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. POLISSACARÍDEO - P1	51
4.2. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	52
4.2.1. Linhagem celular	52
4.2.2. Migração celular	54
4.2.3. Citometria de fluxo	55
4.2.4. Expressão gênica	56
4.2.5. Marcação metabólica dos glicosaminoglicanos sulfatados	57
4.2.6. Dosagem de ácido hialurônico	58
4.3. ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	60
4.3.1. Animais	60
4.3.2. Dacarbazina	62
4.3.3. Avaliação do volume tumoral	62
4.3.4. Avaliação do peso dos órgãos, hemograma completo e perfil bioquímico	63
4.3.5. Avaliação da evolução tumoral	64
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
5. RESULTADOS	65
5.1. P1 REDUZ A MIGRAÇÃO CELULAR	65
5.2. P1 AUMENTA MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR	67
5.3. O TRATAMENTO COM P1 LEVA A ALTERAÇÕES DE PGHS	69
5.4. P1 REDUZ EXPRESSÃO GENICA DE MMP-9	71
5.5. P1 REDUZ HEPARANASE E RESULTA EM AUMENTO DE HS	73
5.6. O TRATAMENTO COM P1 LEVA A MENOR PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO	75
5.7. P1 REDUZ O VOLUME TUMORAL EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA	79
5.8. P1 REDUZ O VOLUME TUMORAL INDEPENDENTE DE ALTERAÇÃO DE OSMOLARIDADE	81
5.9. P1 TEM EFEITO ADJUVANTE ASSOCIADO À DACARBAZINA	83
5.10. P1 LEVA A REGRESSÃO TUMORAL	85
5.11. O TRATAMENTO COM P1 NÃO ALTERA PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	87
5.12. HEMOGRAMA	89
5.13. O TRATAMENTO COM P1 NÃO ALTERA OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	91
5.14. P1 ATUA VIA GALECTINA-3	93
6. DISCUSSÃO	97
7. CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS	111

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, gerando assim a metástase (INCA, 2016a). Esta doença também demonstra, pela estatística, que o número de causas de morte no mundo cresce a cada ano, prevendo um grande crescimento nos próximos anos (“WHO | Cancer”, 2016).

Dentre os tipos de câncer de pele, o melanoma cutâneo é um tipo que tem origem em células dendríticas produtoras de melanina, que se chamam melanócitos; sendo este altamente metastático (INCA, 2016b). Os tratamentos atuais são ineficientes e possuem muitos efeitos colaterais, o que justifica a busca por novos compostos que sejam mais efetivos com reduzido efeitos adversos. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa está atuando, e no presente trabalho buscou-se um composto de origem natural, em especial extraído de cogumelos.

Cogumelos são conhecidos popularmente há milhares de anos, por serem promotores da saúde, pois suas macromoléculas, como os polissacarídeos, são considerados seus maiores constituintes biológicos exercendo ação medicinal. Mas nem todas as espécies de cogumelos e os seus polissacarídeos constituintes são estudados e conhecidos pela ciência. Neste sentido, destacam-se os componentes do cogumelo *Pleurotus eryngii*, que também não são plenamente conhecidos, e por outro lado, trata-se de uma espécie de cogumelo bastante consumido no norte da África, Europa e Ásia, com conhecido potencial farmacológico importante, incluindo efeito antitumoral (FU; LIU; ZHANG, 2016).

Resultados obtidos anteriormente (BISCAIA, 2012) mostraram efeitos promissores para o tratamento do melanoma, após uso do polissacarídeo P1, que é uma manogalactana parcialmente metilada (nova molécula), extraída de cogumelo *Pleurotus eringii*. Os resultados mostraram que P1 não é citotóxico, reduz a invasão celular e aumenta o espriamento sobre moléculas de matriz específicas.

Assim, neste trabalho, busca-se entender o mecanismo de ação do P1 *in vitro*, além de avaliar seu potencial de ação *in vivo*.

1.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o potencial antitumoral da manogalactana parcialmente metilada (P1), extraída do cogumelo *Pleurotus eryngii*, em modelos de melanoma murino *in vitro* e *in vivo*.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral, propõem-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar se o polissacarídeo P1 é capaz de interferir no processo de migração celular;
- Entender, quais moléculas chaves estão envolvidas na redução da invasão celular, causada pelo tratamento com P1.
- Avaliar se P1 pode interferir com a evolução tumoral *in vivo*;
- Avaliar se o P1 exerce um efeito adjuvante a um quimioterápico conhecido;
- Analisar se P1 pode ter efeitos adversos;
- Avaliar o mecanismo de ação de P1 *in vivo*.

2. JUSTIFICATIVA

Câncer é o nome dado a um grupo de doenças que possuem como característica principal o crescimento desordenado de células. Trata-se de uma das principais causas de morte no mundo, com um crescimento estimado na ordem de 70% de novos casos nos próximos 20 anos (“WHO | Cancer”, 2016).

Dentre os tipos de câncer de pele, o do tipo melanoma destaca-se por ser um câncer de pele de menor incidência, mas de alta agressividade, com alto poder metastático. Os tratamentos atuais envolvem uso de quimioterapia e/ou imunoterapia, mas ainda possuem baixa taxa de resposta e elevados efeitos colaterais.

O presente projeto busca investigar se um composto que não é citotóxico, mas que alterou a capacidade de invasão das células tumorais pode possuir uma ação antitumoral sobre o melanoma *in vivo*, sem efeitos adversos.

Face ao exposto, o trabalho foi dividido em duas abordagens, sendo: uma análise molecular para entender as alterações observadas *in vitro* e outra sobre seu possível efeito *in vivo*.

Vale destacar que os componentes que estão envolvidos no processo de desenvolvimento tumoral e metástases são as moléculas de matriz extracelular, metaloproteases, *shedases*, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e moléculas envolvidas na adesão e migração celular (ROZARIO; DESIMONE, 2010), bem como os ligantes de carboidratos (CARDOSO et al., 2016), o que justifica a análise dessas moléculas para entender o modo de ação de P1 *in vitro*.

Considerando que a fonte de origem do polissacarídeo em estudo é um cogumelo comestível (*Pleurotus eryngii*) consumido mundialmente e muitos trabalhos relatam o potencial antitumoral de polissacarídeos extraídos de cogumelos comestíveis (ZONG; CAO; WANG, 2012), e seu uso *in vitro* demonstrou não citotóxico; neste trabalho investigamos esse novo composto, enfocando sua possível ação antimelanoma *in vivo* e sua possível ação sem efeitos adversos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CÂNCER

O termo Câncer é originado da palavra grega *karkinos*, que quer dizer caranguejo, pois as veias intumescidas que circundavam o tumor tinham a aparência das patas de um caranguejo. Este termo foi utilizado pela primeira vez por Hipócrates (o pai da Medicina, o qual viveu entre 460 e 377 a. C.) e descrevia a doença de seus pacientes como inchaços não curáveis, com posteriores sangramentos seguidos de morte (INCA, 2012; WEISS, 2000).

Câncer pode ser considerado como uma ruptura da homeostase; que em condições normais, controlam os processos em que a célula permanece quiescente, diferencia-se ou sofre apoptose (HAASS; SMALLEY; HERLYN, 2004).

Esta doença surge de uma única célula normal que é transformada em célula tumoral, devido a vários processos de transformação. Esta transformação é resultado de interações entre os fatores genéticos de uma pessoa e de alguns fatores externos como:

a) agentes carcinogênicos físicos: como raio ultravioleta e radiação ionizante;

b) produtos químicos carcinogênicos: como o amianto, componentes da fumaça do tabaco, a aflatoxina (um contaminante de alimentos) e arsênico (um contaminante da água);

c) agentes carcinogênicos biológicos: como as infecções por alguns tipos de vírus, bactérias ou parasitas.

Outro fator importante para o desenvolvimento do câncer é o envelhecimento, devido ao acúmulo de fatores de riscos que aumentam com a idade. Assim, o acúmulo destes riscos, associados a menor eficácia dos mecanismos de reparação celular, aumenta a possibilidade de alterações celulares (WCRF, 2016; WHO, 2016).

Câncer é uma das principais causas de mortes no mundo, sendo que em 2012 (último dado disponível) o número de novos casos foi de 14,1 milhões, com 8,2 milhões de mortes. As últimas estatísticas, divulgada pela agência Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016), mostram uma previsão de aumento do número de

novos casos de câncer em cerca de 70% nos próximos 20 anos; esperando um aumento para 24 milhões em 2035 (WCRF, 2016).

Cerca de 30% das mortes por câncer são devidas a cinco principais riscos comportamentais e nutricionais, como:

- a) elevado índice de massa corpórea;
- b) baixa ingestão de frutas e legumes;
- c) falta de atividade física;
- d) tabagismo;
- e) uso de álcool.

A América do Sul, América Central, África e Ásia somam um total de 60% dos novos casos de câncer no mundo, e são responsáveis por 70% das mortes por câncer (WCRF, 2016; WHO, 2016).

A Austrália e a Nova Zelândia detém as maiores taxas de incidência de melanoma no mundo, e os níveis continuam a subir, segundo o relatório publicado pelo Instituto Australiano de Saúde e Bem-Estar, sendo na Austrália o melanoma 1 dos 10 mais comuns tipos de câncer no país (CANCER AUSTRALIAN, 2016).

Existem mais de 100 tipos de câncer, e sua nomenclatura está relacionada ao tipo celular que originou o tumor. Vale salientar que câncer é resultante de um tumor maligno, isto é, que gera metástase. Mas existem também tumores que são denominados de benignos.

Nos tumores benignos existe um tipo de crescimento celular organizado, mais lento, mas apresenta limites definidos. Apesar de não invadir outros tecidos, eles podem comprimir tecidos adjacentes ou órgãos. Nos tumores benignos, existe uma regra da nomenclatura para se acrescentar o sufixo – oma (tumor) ao termo que se refere ao tecido de origem do tumor, como por exemplo, o tumor benigno do tecido gorduroso: lipoma (INCA, 2012).

Nos tumores malignos as células podem invadir o tecido, sair para a corrente sanguínea, migrar para outros tecidos e se estabelecer e proliferar em outros locais, constituindo o processo de metástase. Sua nomenclatura considera a origem embrionária dos tecidos que derivou o tumor, como por exemplo, tumores malignos originado dos epitélios de revestimento externo e interno são denominados carcinomas; quando o epitélio de origem é glandular, passam a ser chamados adenocarcinomas. E quando os tumores malignos são originados dos tecidos

conjuntivos (mesenquimais) são acrescentados de sarcoma ao final do nome do tecido correspondente, por exemplo, tumor do tecido ósseo – osteossarcoma. Pode-se também acrescentar a topografia ao tipo histológico, como por exemplo, adenocarcinoma de pâncreas (INCA, 2012).

3.1.1. CÂNCER DE PELE

A pele protege o corpo do calor, luz solar, lesão e infecções, além de controlar a temperatura corpórea, também armazena água e gordura. A pele pode ser dividida em camadas, como a derme e a epiderme (Figura 1) (NCI - SKIN CANCER, 2016).

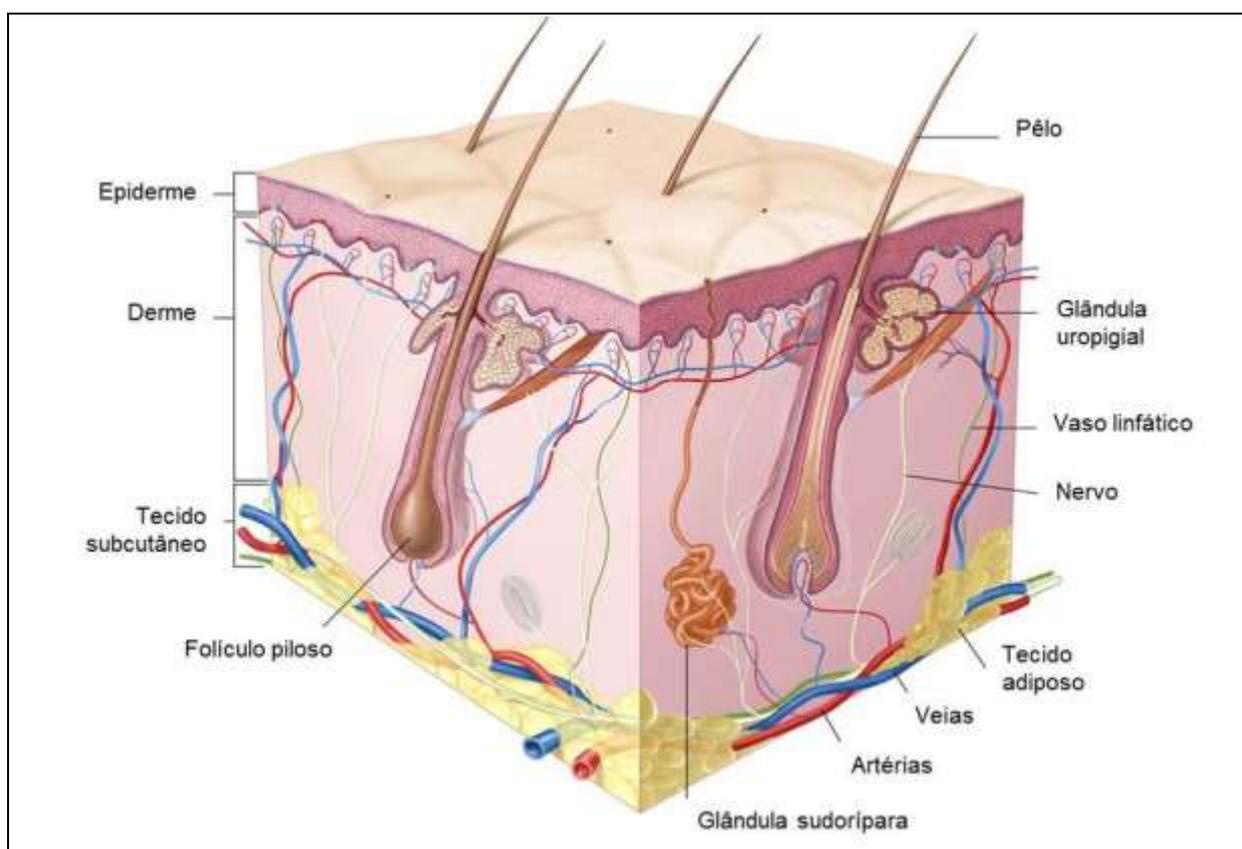


FIGURA 1. Pele normal. A figura acima demonstra a pele normal, com suas camadas como a epiderme e a derme; bem como seus componentes estruturais. FONTE: Figura adaptada: (NCI - SKIN CANCER, 2016).

Câncer de pele é o tipo de neoplasia mais frequente no Brasil e corresponde a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA, 2016b). Geralmente acontece devido à exposição ao sol, e ocorrem primeiramente na

epiderme (camada externa), que é composta de células escamosas, células basais e melanócitos (NCI - SKIN CANCER, 2016).

Carcinoma basocelular (CBC) é o tipo de câncer de pele mais frequente, e que se inicia em células basais (MAYO, 2015), as quais se encontram na camada mais externa da pele. CBC frequentemente se manifesta por feridas abertas, manchas vermelhas, bordas cor de rosa, são brilhantes, tem cicatrizes e são geralmente causadas por exposição prolongada ao sol (Figura 2.1). CBC, se não tratado rapidamente, pode deixar cicatrizes desfigurantes; dificilmente causa metástase, mas em casos raros pode ser fatal (SKINCANCER, 2016).

1. CARCINOMA BASOCELULAR	2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS	3. OUTROS	4. MELANOMA
			
<p>A. Tipo superficial; B. Tipo pigmentado, ulcerado, nodular; C. Tipo nodular; D. Tipo pigmentado, nodular.</p>	<p>A. <i>In situ</i>; B. Bem diferenciada; C. Moderadamente diferenciada.</p>	<p>A. Dermatoficrossarcoma Protuberante; B. Carcinoma de células de Merkel; C. Linfoma de célula T cutâneo; D. Sarcoma de Kaposi.</p>	<p>A. Tipo maligno; B. Tipo nodular; C. Tipo nodular.</p>

FIGURA 2. Tipos de Câncer de pele. As figuras acima demonstram as várias formas, colorações, origens celulares e localizações dos tipos de câncer de pele. Também podem se observar em cada coluna as diferenças de progressões de cada câncer especificadamente. FONTE: Figura adaptada: (GANDHI; KAMPP, 2015).

A renovação da camada externa da pele se dá pela escamação dos queratinócitos mais externos e multiplicação dos queratinócitos internos. À medida que as células se renovam mais internamente, elas se movem para a parte mais externa da pele e se tornam células escamosas achatadas. Quando há uma alteração nestes tipos celulares mais externos, se tornando câncer, ele é denominado de carcinoma de células escamosas (Figura 2.2) (MAYO, 2016).

Também há outros tipos de câncer de pele, que geralmente não são referenciados como malignidades cutâneas, tais como o sarcoma de Kaposi, linfoma cutâneo, e carcinoma de células de Merkel, mas estes precisam ser considerados quando os pacientes apresentam novas lesões específicas ou mudança de padrão na lesão original (GANDHI; KAMPP, 2015) (Figura 2.3). Por outro lado, há câncer de pele que se origina de melanócitos. Este câncer se chama melanoma (Figura 2.4) (MAYO, 2016).

3.1.2. MELANOMA

Como discutido anteriormente, o melanoma é um tumor maligno que tem início em células da pele, que estão localizadas na camada basal da epiderme (Figura 3), denominadas de melanócitos (células produtoras de melanina). Este câncer pode ter início a partir de um *nevus* benigno, mas pode também originar-se a partir de células pigmentadas presentes nos olhos e intestino (ELDER, 2015; INCA, 2016b; MAYO, 2016). O melanoma é o foco deste trabalho.

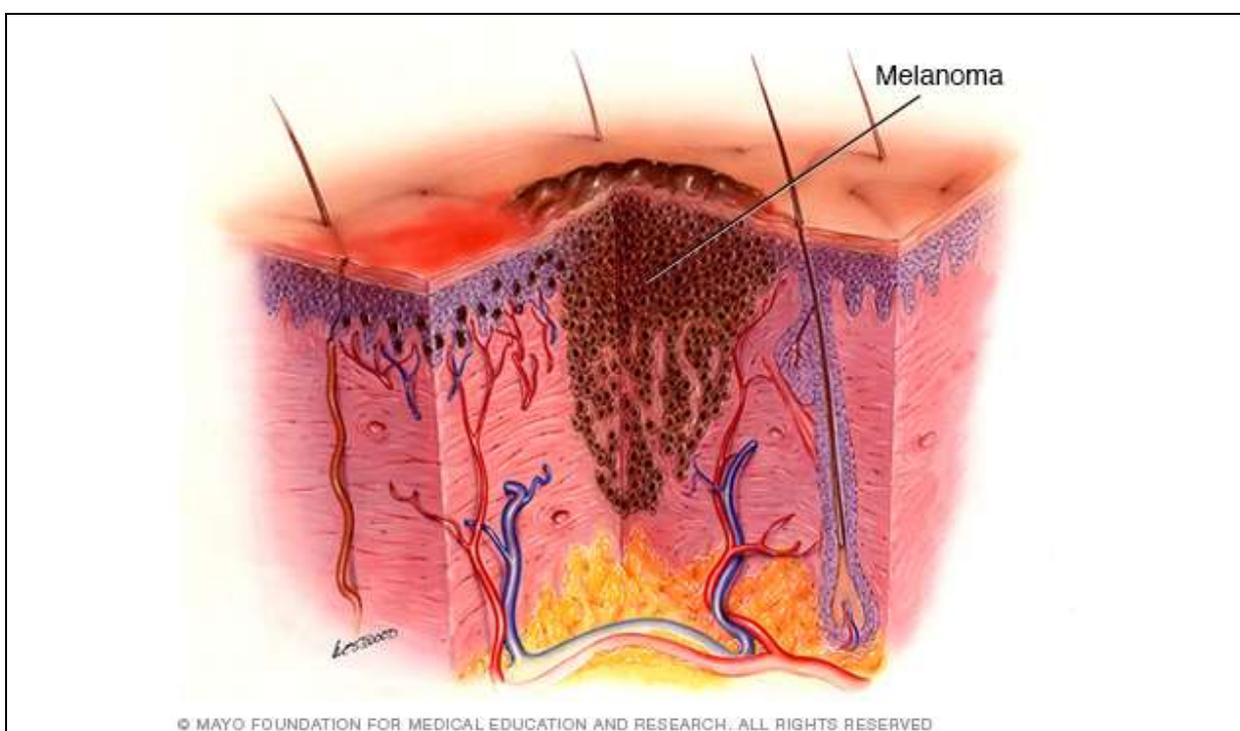


FIGURA 3. O melanoma. Trata-se de uma forma de câncer de pele que começa nas células (melanócitos) que controlam o pigmento da pele. Observa-se nesta ilustração o melanoma, num processo de invasão do tecido, se estendendo desde a superfície, para a camada mais profunda da pele. FONTE: (MAYO, 2016).

Os melanócitos são um grupo de células que têm a capacidade de produzir melanina, e se originam de células embrionárias da crista neural. No estágio de maturação os melanócitos produzem melanina em organelas específicas que se chamam melanosomos (CICHOREK et al., 2013).

Em condições fisiológicas normais, os melanócitos em repouso formam uma “unidade de melanina epidérmica” junto com queratinócitos na epiderme. Este equilíbrio entre melanócitos e queratinócitos é mantido através da regulação da indução de divisão dos melanócitos. Durante este processo, os melanócitos se desacoplam dos queratinócitos, retraem seus dendritos, dividem-se e migram ao longo da membrana basal antes de finalmente se reunirem aos queratinócitos novamente. O desequilíbrio da homeostase pode perturbar o equilíbrio da “unidade de melanina epidérmica” e assim pode desencadear uma proliferação descontrolada e contínua dos melanócitos, gerando assim o melanoma maligno (HAASS; SMALLEY; HERLYN, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Embora câncer de pele seja o tipo mais frequente no Brasil, o melanoma representa apenas 4% destas neoplasias malignas, mas é o mais grave, pois tem um alto índice de metástase e morte (INCA, 2016b).

A literatura relata fatores genéticos associados ao risco de se desenvolver melanoma, como: descendência europeia, cabelos loiros ou vermelhos, tom de pele clara, olhos claros, presença de sardas e/ou *nevus* melanocíticos e história familiar de melanoma maligno. Outro fator de risco inclui histórico de queimaduras solares (um elevado número de queimaduras ao longo da vida), ou frequente exposição ao sol (SCHMERLING et al., 2011).

Segundo Shain e Bastian (2016) os melanomas apresentam mutações gênicas clássicas durante a sua progressão. As mutações somáticas mais recorrentes são as CSD (danificadas cronicamente pelo sol) e não-CSD, afetando os genes das principais vias de sinalização responsáveis pela proliferação (BRAF, NRAS e NF1), crescimento e metabolismo (PTEN e KIT), identidade celular (domínio de interação rico em AT 2 (ARID2)), resistência à apoptose (TP53), controle do ciclo celular (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A)), que codifica p16^{INK4A} e p14^{ARF}) e da vida replicativa (telomerase reverse transcriptase (TERT)).

3.2. MICROAMBIENTE TUMORAL

A maior prevalência dos cânceres humanos são os carcinomas e surgem de tecidos epiteliais, que são separados do tecido conjuntivo (denominado estroma) pela membrana basal (WEINBERG, 2014).

Atualmente, as estratégias de tratamento para os carcinomas não envolvem apenas a busca do alvo nas células epiteliais, mas também nos fibroblastos associados ao câncer, bem como em todos os componentes do estroma, sendo denominado o microambiente tumoral (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010b).

A progressão tumoral tanto nas células cancerosas, como no microambiente do tumor, desenvolvem uma coevolução de dois modos: (1) as alterações do estroma ocorrem por primeiro e daí levam a proliferação das células epiteliais, o que aumenta indiretamente o risco de transformação devido ao aumento de proliferação; (2) a transformação das células epiteliais ocorre por primeiro e então podem ativar as células do estroma de forma parácrina (POLYAK; HAVIV; CAMPBELL, 2009) (POLYAK et al., 2009).

O microambiente tumoral é muito importante para o desenvolvimento do tumor, pois estas células presentes, como as endoteliais, de músculo liso, inflamatórias e imunológicas, possuem diversas funções como nutrição, oxigenação, bem como supressão ou promoção tumoral (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010b).

Os fibroblastos formam a estrutura do estroma tumoral, sendo estas as células mais abundantes e secretam componentes da matriz extracelular (MEC), como colágeno e fibronectina (ZHOU et al., 2015).

Em condições normais estes fibroblastos estão em estado inativo quiescentes; tornando-se ativos para um processo que necessita a cicatrização como em feridas ou fibroses, condições que induzem o remodelamento de MEC (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010a).

No microambiente tumoral, os melanócitos, queratinócitos e fibroblastos são muito importantes para o desenvolvimento de tumores sólidos. Os melanócitos secretam fatores que ativam o estroma, pois promovem a comunicação com fibroblastos. Os fibroblastos associados ao câncer (FAC) são os fibroblastos que foram ativados, e então recrutados pelas células tumorais e assim associados ao câncer. FAC secretam fatores promotores de crescimento que estimulam a

proliferação tumoral, bem como fatores angiogênicos e moduladores da MEC (FIGURA 4) (MICKE; ÖSTMAN, 2005).

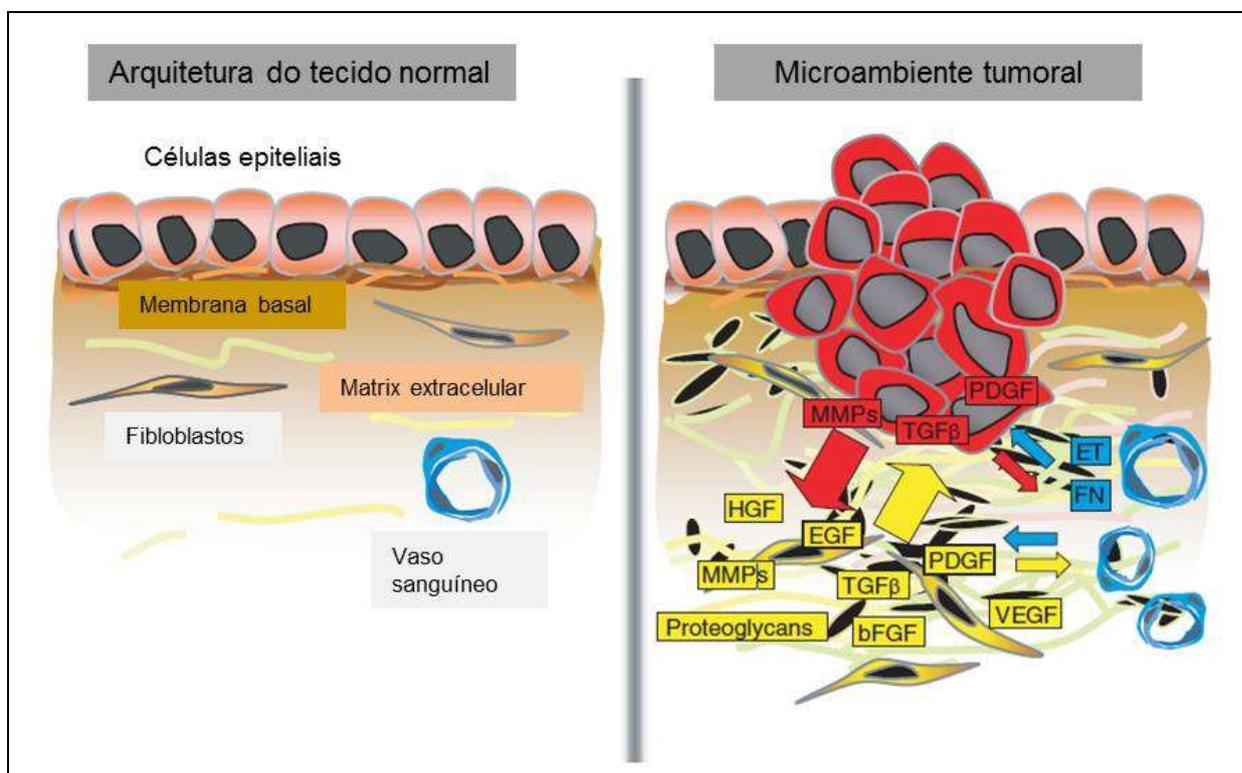


FIGURA 4. Relação entre células da pele normal e do microambiente tumoral. No microambiente tumoral alguns fatores são secretados, como: **bFGF**: Fator de crescimento de fibroblastos básico; **EGF**: fator de crescimento endotelial; **ET**: endotelina; **FN**: fibronectina; **HGF**: Fator de crescimento de hepatócitos; **MMP**: metaloproteases; **PDGF**: fator de crescimento derivado de plaquetas; **TGF**: fator de crescimento transformante **VEGF**: Fator de crescimento endotelial vascular. FONTE: Figura adaptada: MICKE; ÖSTMAN, 2005.

O aumento do número de fibroblastos associados ao câncer (FAC) no estroma tem sido reportado como uma correlação para aumento do risco de metástase e um pior prognóstico em cânceres (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010b).

Melanócitos normais estão localizados na epiderme e perto da membrana basal formando uma unidade epidérmica de melanina, nesta unidade contém em torno de um melanócito para até trinta e seis queratinócitos. Melanócitos malignos proliferam e penetram na membrana basal e assim invadem a derme subjacente (FIGURA 5) (ZHOU et al., 2015).

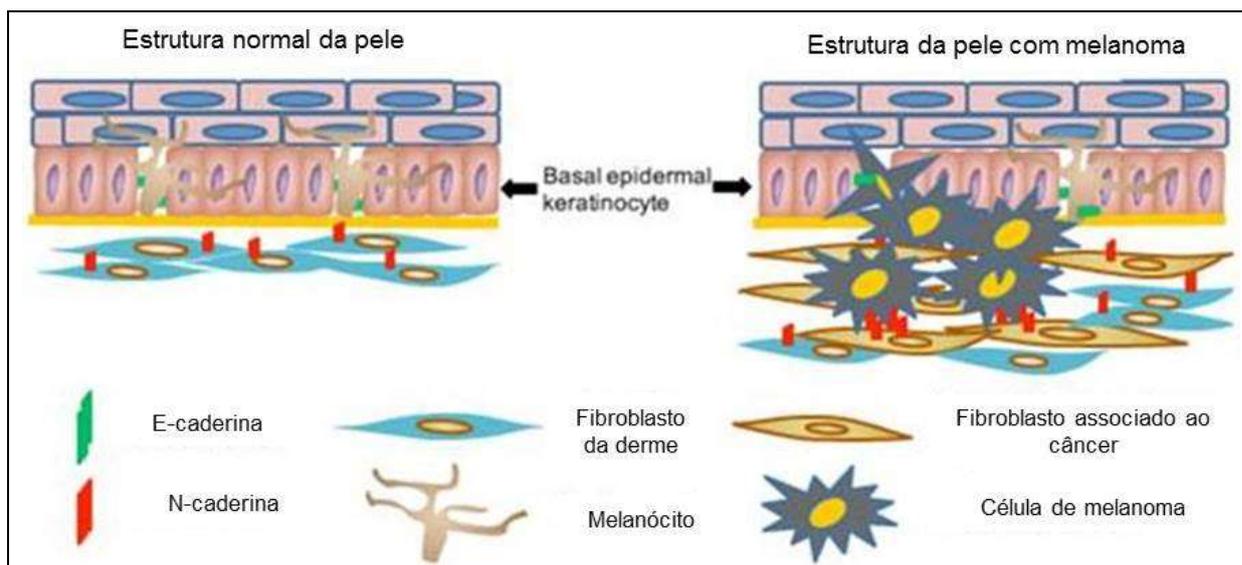


FIGURA 5. Estrutura de adesão da pele normal e do melanoma. Os melanócitos são aderentes aos queratinócitos devido à expressão de E-caderina (barra verde); mas quando ocorre a invasão e metástase no melanoma, induz à mudança de expressão da E-caderina para N-caderina (barra vermelha), que assim permitindo a ligação dos melanócitos tumorais aos fibroblastos. Este mecanismo permite que o melanoma se afaste dos queratinócitos e invada a derme subjacente para posteriormente chegar aos vasos sanguíneos e linfáticos. (A membrana basal está indicada pela linha amarela). FONTE: Figura adaptada: (ZHOU et al., 2015).

O desenvolvimento do câncer é dado juntamente com o recrutamento de fibroblastos e o surgimento de vasos sanguíneos. As células neoplásicas secretam fatores que ativam o estroma e assim estes fatores são capazes de promover a invasão, migração e o crescimento tumoral (MICKE; OSTMAN, 2005; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010b).

No início do desenvolvimento do melanoma, os fibroblastos quiescentes criam uma barreira e produzem fatores (com base em suas capacidades de mobilizar células do sistema imunológico) como citocinas, tais como o interferon gama (IFN- γ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que inibem o crescimento tumoral.

Durante o desenvolvimento do melanoma, algumas células são estimuladas a induzir transformações epigenéticas, celulares e bioquímicas nos fibroblastos do estroma e conseqüentemente se transformam em FAC. Após esta ativação, as células de melanoma e os fibroblastos interagem e constroem um microambiente para progressão tumoral, metástase e resistência a drogas (ZHOU et al., 2015) (FIGURA 6).

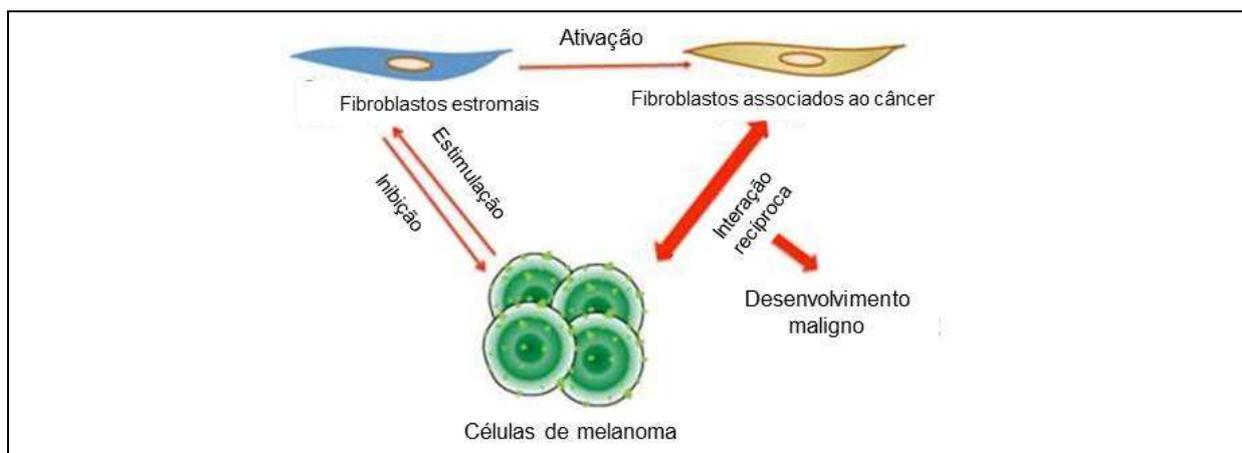


FIGURA 6. Ilustração da interação e coevolução entre fibroblastos do estroma, fibroblastos associados ao câncer (FACs) e melanoma. A figura acima ilustra, de forma esquemática, as possíveis interações recíprocas e coevolução dos fibroblastos do estroma, dos FACs e das células de melanoma. Demonstrando que inicialmente os fibroblastos do estroma inibem as células de melanoma. Posteriormente, as células de melanoma estimulam os fibroblastos e assim eles são ativados e se transformam em FACs. Após essa ativação, os FACs e o melanoma têm uma interação recíproca e coevoluem para o desenvolvimento da malignidade do tumor. FONTE: Figura adaptada: ZHOU et al., 2015.

Relatos da literatura demonstram que FACs são capazes de produzir, em grande quantidade, o glicosaminoglicano (GAG) ácido hialurônico (importante constituinte da matriz extracelular), o que gera grande impacto na iniciação e progressão do câncer, via interações celulares câncer-estroma, e isto pode promover a invasão celular (ITANO; ZHUO; KIMATA, 2008; ZHOU et al., 2015) (Figura 7).

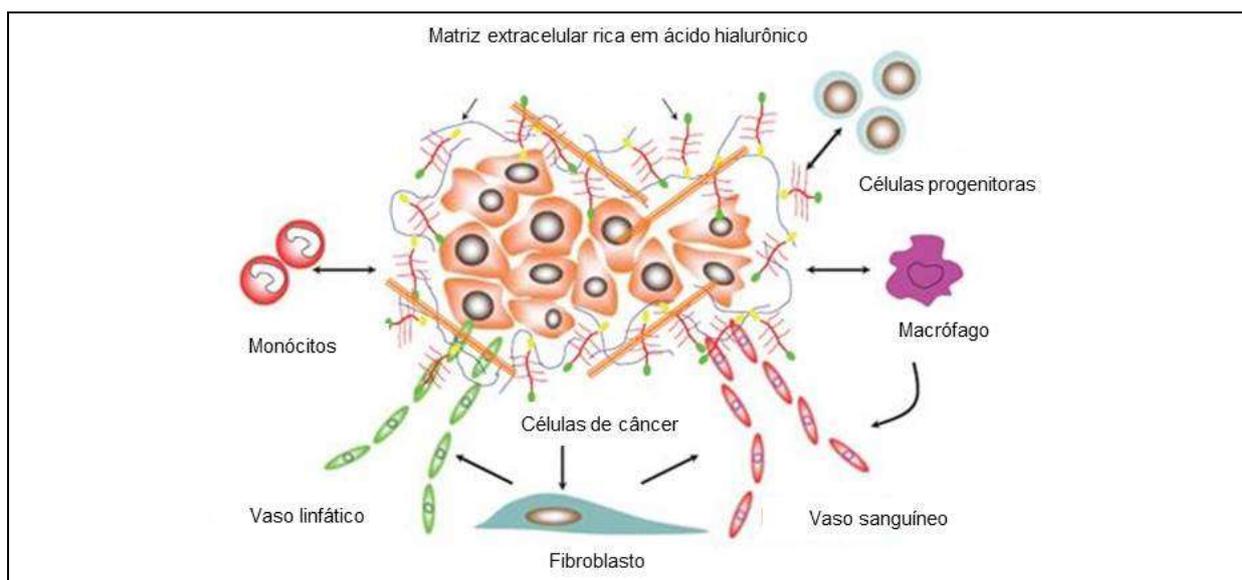


FIGURA 7. Interações das células hospedeiras tumorais no microambiente tumoral. O ácido hialurônico (AH) é parte do microambiente tumoral através de ligações com agregados macromoleculares. Um microambiente tumoral, rico em AH, acelera o recrutamento de monócitos e macrófagos; também acelera a angiogênese e a linfangogênese, pelo estímulo das infiltrações de células endoteliais e o recrutamento de células progenitoras da medula óssea. FONTE: Figura adaptada: ITANO; ZHUO; KIMATA, 2008.

3.2.1. MATRIZ EXTRACELULAR

Matriz extracelular (MEC) é um conjunto de macromoléculas, formando uma rede supramolecular, altamente dinâmica, que é continuamente remodelada por uma série de enzimas de degradação, durante processos normais e condições patológicas. A MEC pode ser composta por colágenos, elastina, fibronectina, lamininas e uma série de outras glicoproteínas, além de proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs). Todos os tipos celulares (epiteliais, fibroblastos, células do sistema imunológico, células endoteliais) sintetizam e secretam, de forma específica, um conjunto de macromoléculas da MEC sob o controle de múltiplos sinais (ROZARIO; DESIMONE, 2010; THEOCHARIS et al., 2016).

Estes componentes da MEC estão interligados uns aos outros, e também podem fazer ligações com os receptores celulares formando uma grande rede entre as células e os tecidos. A MEC é dinâmica, isto é, está em constante reorganização, e também pode contribuir para desencadear sinais para as células a partir de sua ligação aos receptores, e desta maneira regula uma diversidade de funções celulares como a sobrevivência, migração e diferenciação, bem como a manutenção da homeostase celular (THEOCHARIS et al., 2016).

A MEC serve também como um “reservatório” de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, que são depositados através de ligações com as moléculas de MEC específicas, podendo ser liberados após sinais fisiológicos que são enviados no tempo adequado. Esses fatores podem ser liberados a partir da degradação, total ou parcial, da MEC e então se ligam em receptores específicos para fatores de crescimento e correceptores, como os proteoglicanos sindecam e glicam, e desta maneira ativam vias de sinalização (THEOCHARIS et al., 2016).

A MEC é dividida em dois grandes grupos que variam na sua composição e estrutura: a matriz intersticial e a matriz pericelular. A intersticial está ao redor das células e a pericelular está em contato direto com a célula (Figura 8). A matriz pericelular é encontrada entre as células epiteliais e do tecido conjuntivo, composta por uma rede de colágenos, laminina e perlecan. As células epiteliais são ancoradas à membrana basal por hemidesmossomos, formados através da interação de integrinas com a laminina. A matriz intersticial é composta por fibrilas de colágeno,

elastina, PGs secretados, ácido hialurônico (AH) e proteínas (THEOCHARIS et al., 2016).

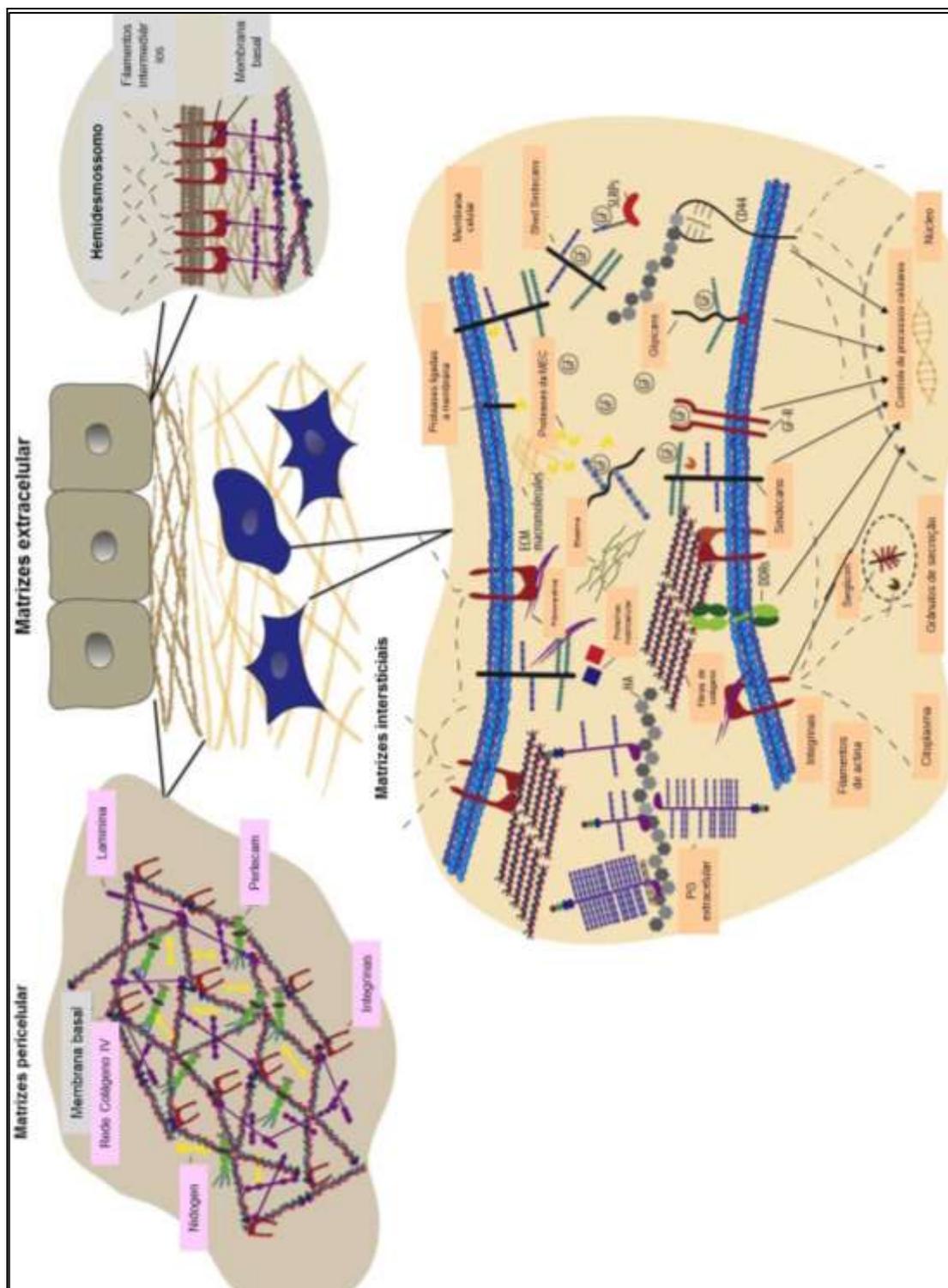


FIGURA 8. Esquema de matriz extracelular (MEC), seus principais componentes e receptores de superfície celular. A figura acima ilustra os dois principais grupos de componentes da Matriz intersticial e pericelular. Também se observam os hemidesmossomos que ancoram as células epiteliais, através de ligações com as laminina (na MEC). Na parte inferior da figura estão ilustradas as interações entre duas células, que são mediadas por componentes da MEC. FONTE: Figura adaptada: THEOCHARIS et al., 2016.

Estas moléculas interagem umas com as outras e formam uma grande rede tridimensional. As células se ligam a MEC por receptores celulares específicos, como integrinas, PGs de superfície celular (sindecam, glicpam, CD44 - receptor de AH, e receptores de domínio de discoidim (DDR) (THEOCHARIS et al., 2016).

MEC e seus receptores celulares interagem como mediadores, tanto de ligações físicas, da MEC com o citoesqueleto, quanto do fluxo bidirecional de informações dos compartimentos intracelular e extracelular. A MEC é multifuncional e influencia processos bioquímicos e mecânicos simultaneamente. É altamente dinâmica e pode ser modificada pelas células que entram em contato com ela, criando um modo bidirecional de comunicação célula-MEC. As interações MEC-MEC variam de acordo com a composição química e mecânica do microambiente extracelular (ROZARIO; DESIMONE, 2010) (Figura 9).

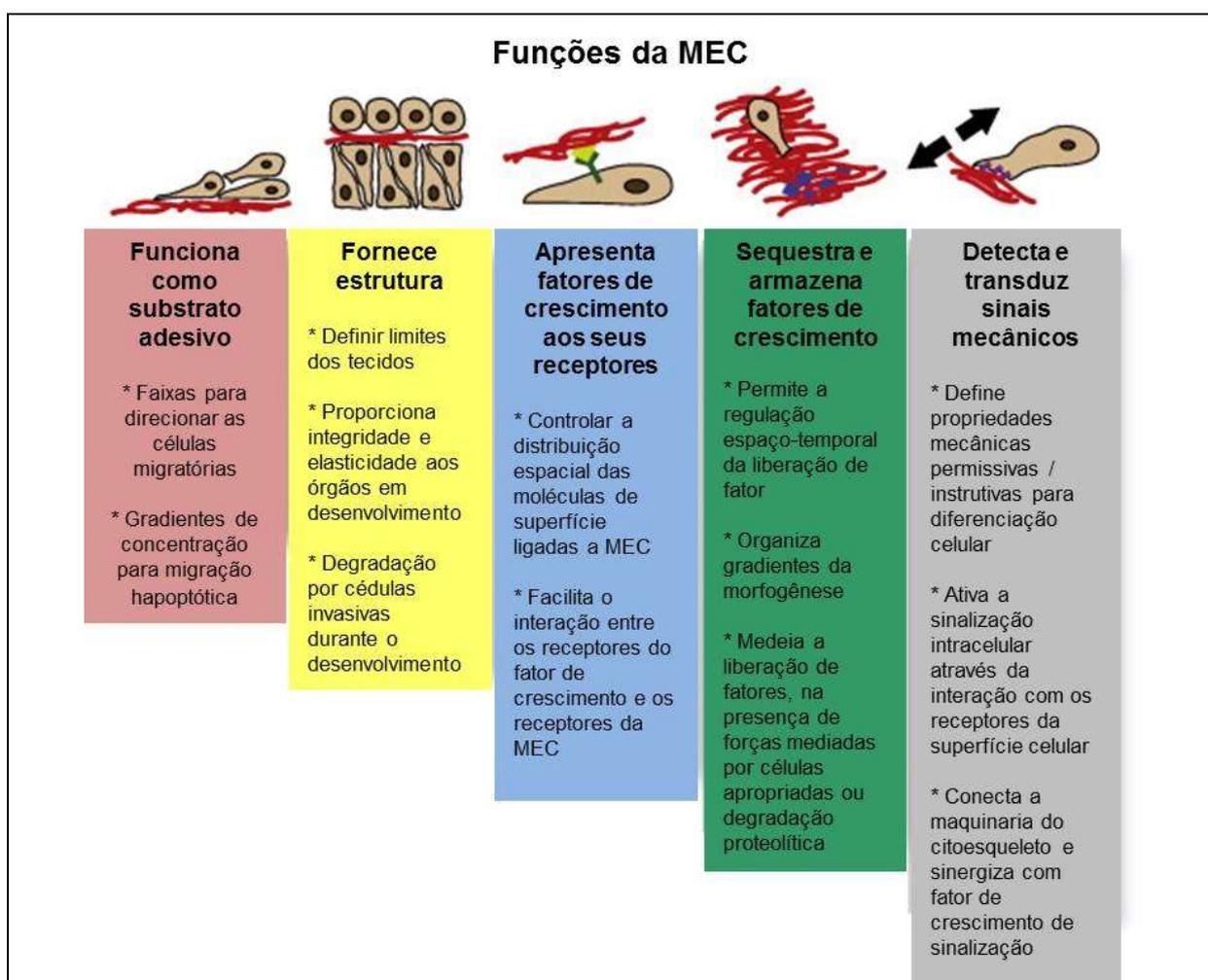


FIGURA 9. Síntese das funções da MEC. A MEC é multifuncional e pode influenciar vários processos bioquímicos e mecânicos ao mesmo tempo. Aqui são classificadas cinco grandes categorias, de acordo com o estado funcional da MEC e seu contexto biológico. FONTE: Figura adaptada: Rozario e De Simone, 2010.

Proteínas da MEC e os fatores secretados por FAC também podem exercer efeitos supressores tumorais nos estágios de progressão tumoral (ZHOU et al., 2015).

Como já mencionado anteriormente, a MEC é composta de várias famílias, como os glicosaminoglicanos (GAGs) e os proteoglicanos (PGs) (ROZARIO; DESIMONE, 2010). Desta forma, os PGs e GAGs são moléculas muito importantes no estudo do microambiente tumoral.

3.2.2. GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS

3.2.2.1 Glicosaminoglicanos (GAGs)

Glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos altamente carregados negativamente; são polímeros não ramificados lineares de dissacarídeos constituídos por uma hexosamina (*N*-acetil-*D*-galactosamina ou de *N*-acetil-*D*-glucosamina) e um ácido urônico (ácido *D*-glucurônico ou *L*-idurônico) repetidos (GANDHI; MANCERA, 2008b; THEOCHARIS et al., 2016) (Figura 10). Podem também conter uma galactose, como açúcar não nitrogenado (no caso de Queratam Sulfato) (THEOCHARIS et al., 2016).

Existem seis tipos de GAGs, a saber: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS), heparina (HEP), queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH). A biossíntese desses compostos envolve a via clássica de glicosilação, utilizando o sistema endomembranas celular (retículo e complexo de Golgi). Apenas o AH é sintetizado por enzimas presentes na membrana plasmática, sendo sua localização final o ambiente extracelular (THEOCHARIS et al., 2016).

O AH é um caso à parte e será discutido em outro momento, mas é exceção também quanto à interação com proteínas, pois não se liga covalentemente às proteínas, como os demais GAGs, que fazem essa ligação e formam Proteoglicanos (GANDHI; MANCERA, 2008b).

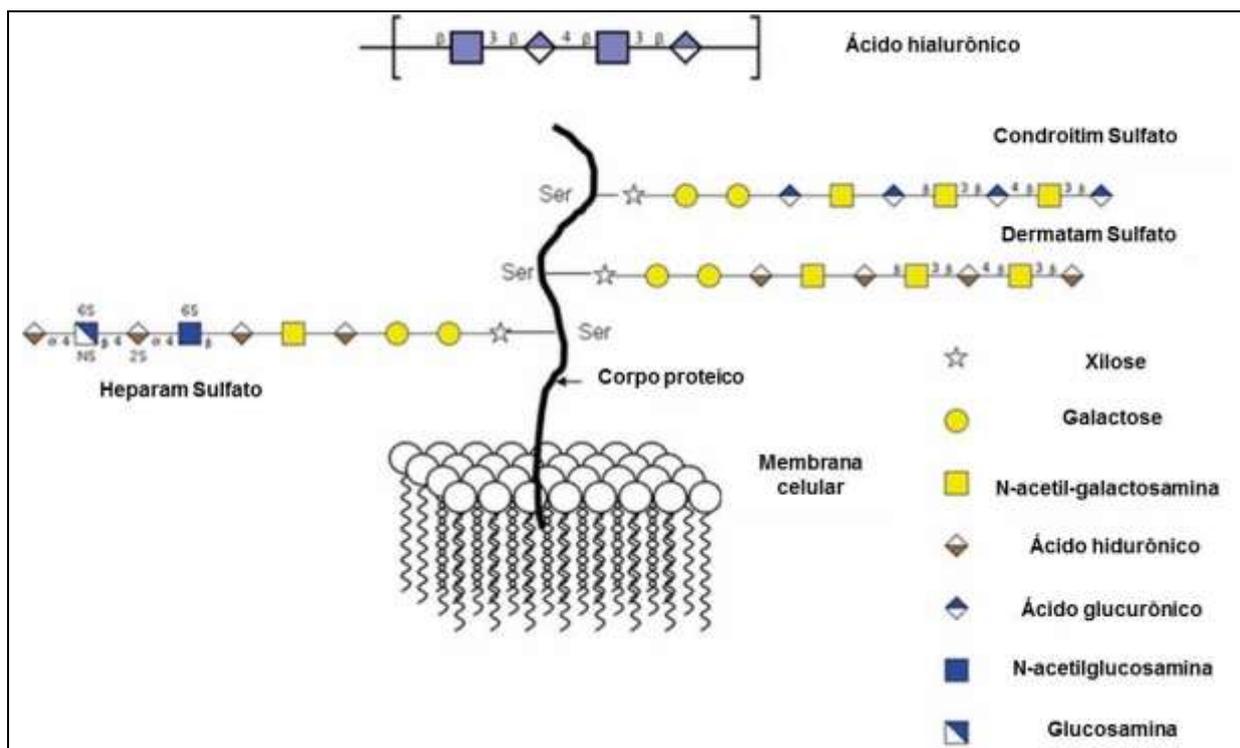


FIGURA 10. Estrutura de ligação dos GAGs nas proteínas formando os proteoglicanos. Heparan sulfato, dermatam sulfato e condroitim sulfato estão ligados a uma proteína através de um resíduo de serina. O ácido hialurônico não é encontrado ligado a nenhum corpo proteico. Figura adaptada: (GANDHI; MANCERA, 2008b).

Os GAGs são longos polímeros com tamanhos muito variados, dependendo do seu tipo e da sua origem do tecido, e podem se apresentar substituídos com grupamentos sulfato em várias posições nas hidroxila de hexosaminas, *D*-galactose e do ácido urônico; ou no grupo amino da hexosamina. AH é o único GAG que, além de não formar PG, não é substituído por grupos sulfato (THEOCHARIS et al., 2016).

Os GAGs são carboidratos importantes que participam da regulação de diversos processos biológicos através de suas ligações com outras moléculas. Esses compostos têm grandes propriedades físicas atribuídas aos grupamentos carboxila, hidroxila e sulfato. Por serem moléculas polianiónicas, muitas de suas interações com outras moléculas são de natureza eletrostáticas, no entanto também são osmoticamente ativas. Sua rede de cargas negativas atraem Na^{++} e, conseqüentemente, água, formando espaços intersticiais em que os GAGs afrouxam. Este inchaço abre vias que promovem a invasão e migração celular (ROZARIO; DESIMONE, 2010; TOOLE, 2001).

3.2.2.2 Proteoglicanos (PGs)

Proteoglicanos (PGs) são macromoléculas constituídas de um corpo proteico sobre o qual uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), do mesmo tipo ou de diferentes tipos, são covalentemente ligadas. PGs estão entre as biomacromoléculas estruturais e funcionais mais importantes nos tecidos (GANDHI; MANCERA, 2008a; THEOCHARIS et al., 2016).

Proteoglicanos são classificados em quatro classes: extracelulares; pericelulares; de superfície celular; ou intracelulares (Figura 11) (IOZZO; SCHAEFER, 2015; THEOCHARIS et al., 2016).

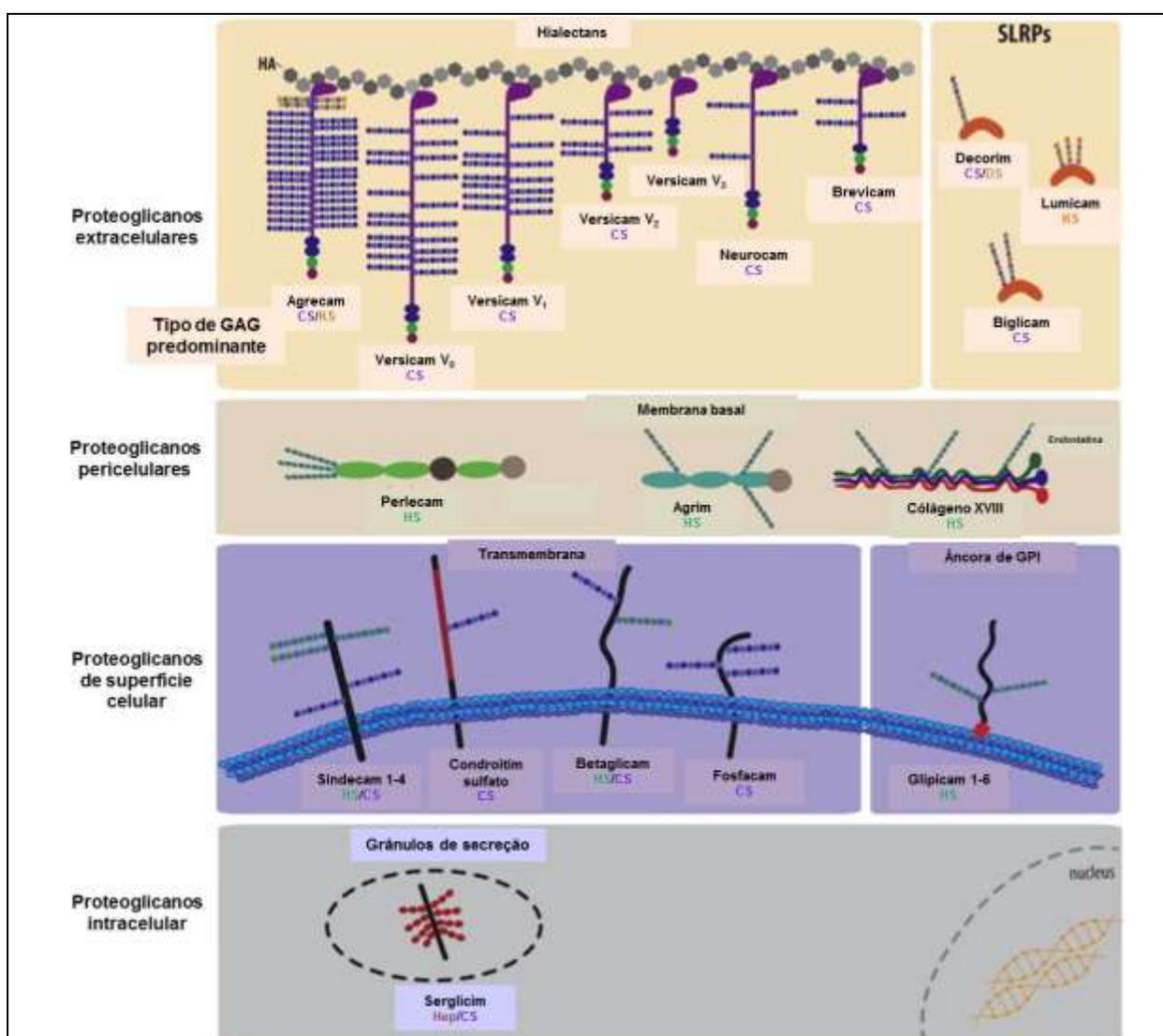


FIGURA 11. Classificação e representação esquemática de proteoglicanos. As quatro grandes classes de proteoglicanos: extracelular, pericelular, de superfície celular e intracelular. Classificados de acordo com sua localização celular. SLRPs – Proteoglicanos pequenos ricos em leucina. FONTE: Figura adaptada: THEOCHARIS *et al.*, 2016.

Recentemente, Iozzo e Schaefer (2015) propuseram que esta classificação fosse subdividida, classificando então as quatro famílias não somente pela localização celular, mas também pela localização subcelular, homologia nos níveis de proteína e genômico e a presença de módulos de proteína únicos que são frequentemente compartilhados por membros de cada classe (Figura 12). Com base na classificação desses autores, os Proteoglicanos de superfície celular foram subdivididos em: Transmembrânicos e Ancorados por Âncora de GPI. Os proteoglicanos Extracelulares foram subdivididos em 4 famílias: Hialectam e Llectam; Spock e os Proteoglicanos pequenos ricos em leucina (SLRPs), canônicos e não canônicos.

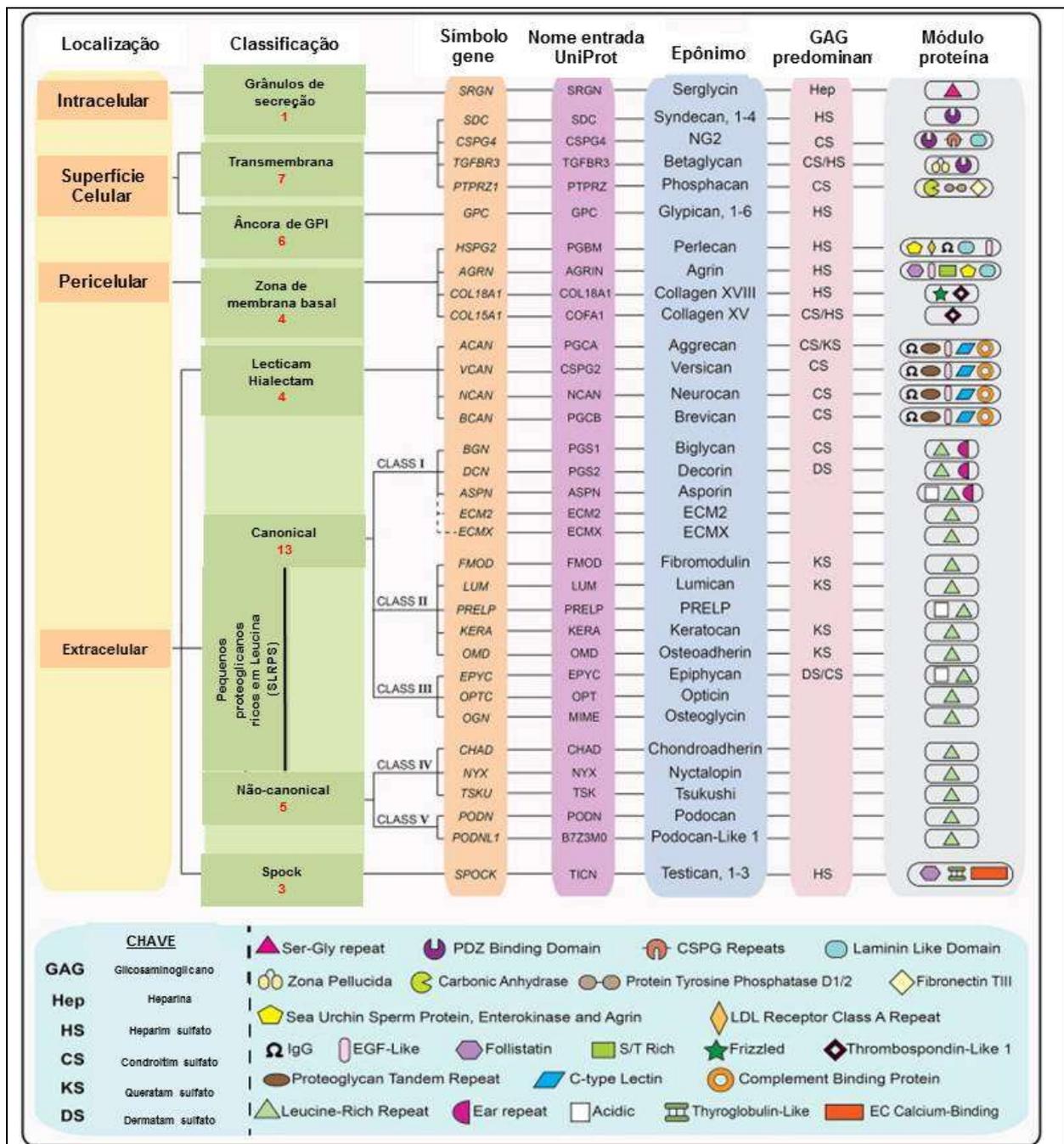


FIGURA 12. Classificação geral dos proteoglicanos (PGs). As quatro famílias dos PGs está baseada na sua localização celular e subcelular. Também demonstra na figura o gene símbolo, a unidade proteica, seu epônimo, o GAG predominante e o módulo da proteína. Demonstrando assim a importância da composição e localização dos PGs para suas atividades biológicas específicas. Note que, por exemplo, que PGs de superfície celular, que antes estavam numa mesma classe, foram subdivididos em duas subclasses distintas, sendo os transmembrânicos e os ancorados por âncora de GPI. FONTE: Figura adaptada: (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

3.2.2.3 Proteoglicanos de Heparan Sulfato (PGHS)

Dentre os exemplos de PGs, temos os proteoglicanos de heparan sulfato (PGHS) da matriz extracelular: como o agrin e perlecan; e os de superfície celular como o sindecam e glicam (THEOCHARIS et al., 2016).

PGHS são componentes importantes da matriz extracelular no desenvolvimento do melanoma, formando a rede complexa do microambiente tumoral, mostrando que, ao longo da progressão do tumor, existe uma relação com as mudanças tanto qualitativa, quanto quantitativa, no conteúdo dos PGHS (NIKITOVIC et al., 2014).

Dentre os PGHS de MEC, destaca-se o perlecan. Esse proteoglicano foi descoberto por Murdock e colaboradores (1992), como sendo da membrana basal.

O perlecan é especialmente relacionado com o desenvolvimento dos tecidos, diferenciação e angiogênese, mediando interações entre célula e a MEC. Serve também como um depósito de fatores de crescimento, armazenando-os e liberando-os, pela degradação proteolítica (do esqueleto proteico) ou das cadeias de heparan sulfato ou, ainda, pela remoção de grupamentos sulfatos específica. Ele também é muito importante em processos de migração, adesão, proliferação, diferenciação celular e invasão (NIKITOVIC et al., 2014; IOZZO e SANDERSON, 2011).

Em melanoma, já é sabido há muito tempo (SHARMA et al., 1998) que o perlecan é um indutor do crescimento tumoral e angiogênese *in vivo*, assim terapias moduladoras de perlecan podem melhorar o tratamento de câncer, inibindo o crescimento tumoral.

Perlecan também regula a atividade de fatores de crescimento afetando as propriedades biológicas das células metastáticas, como crescimento tumoral e neovascularização, e indicam que uma terapia que bloqueie a expressão de perlecan (como uma fita de DNA antisense) seria possível para tratamento antimelanoma (ADATIA et al., 1997; NIKITOVIC et al., 2014).

Já os Sindecans tem papéis como correceptores, trabalhando ao lado de receptores de fatores de crescimento ou receptores de adesão, como as integrinas; também tem a capacidade de sinalizar através de seus domínios citoplasmáticos; muitos proteoglicanos transmembranares se associam a superfície celular com proteases; e demonstram papéis no crescimento, adesão, migração e metabolismo (COUCHMAN, 2010).

O sindecam-1 é um proteoglicano de heparam sulfato, de superfície celular, que se liga aos mediadores de doenças patogênicas. O sindecam-1 modula o recrutamento de leucócitos, a proliferação e a invasão das células de câncer, a angiogênese, a ligação e entrada de microrganismos, mecanismo de defesa do hospedeiro e remodelação da MEC (TENG; AQUINO; PARK, 2012).

Outro sindecam, o sindecam-2 é um mediador crítico na tumorigênese de melanoma, pois foi verificada a sua expressão em amostras de tecido de melanoma maligno, mas não há sua expressão em tecidos de pele humana saudável; dados de alteração na migração e invasão também foram visualizados quando sua expressão estava presente, mostrando que sua presença aumenta a tumorigenicidade (LEE et al., 2009).

O sindecam-4, também tem função na modulação da migração, sendo que sua expressão diminuída reduz a migração das células em melanoma. Células de melanoma produzem abundantemente o fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) que é um importante regulador da proliferação celular, migração e diferenciação. Quando a neutralização de FGF-2 endógeno ocorre, há a modulação da síntese de PGs e GAGs, como o sindecam-4, e assim a expressão diminuída de FGF-2, demonstrou o aumento da motilidade das células de melanoma, e diminuiu sua adesão em fibronectina, mostrando que a modulação da adesão e migração em melanoma é modulada por FGF-2 via mecanismo dependente de sindecam-4 (CHALKIADAKI et al., 2009).

O sindecam-4, um proteoglicano de superfície celular, pode atuar como correceptor de fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (MEC) aumentando a afinidade destas moléculas a seus receptores específicos e também participa da adesão celular nos contatos focais juntamente com integrinas e FAK (quinase de adesão focal), conectando a MEC ao citoesqueleto. Alterações na expressão do sindecam-4 têm sido encontradas em células tumorais, indicando o seu envolvimento em neoplasias (LOPES; DIETRICH; NADER, 2006).

Outros proteoglicanos também são importantes no desenvolvimento tumoral, como o glipicam.

O glipicam-3 tem sido estudado como alvo para imunoterapia, pois é um proteoglicano de superfície celular, que é altamente expresso em cânceres humanos, inclusive em melanoma. Ele tem a capacidade de se ligar a fatores de

crescimento através das cadeias de heparam sulfato. O Glipicam-3 é detectado em estágios iniciais de melanoma, e após remoção cirúrgica do câncer sua dosagem diminui drasticamente (HO; KIM, 2011; NAKATSURA; KAGESHITA; ITO, 2004).

Assim glipicam-3 é considerado um marcador para melanoma, especialmente em estágios iniciais (NAKATSURA; KAGESHITA; ITO, 2004), pois sua alta expressão está correlacionada com um mau prognóstico (SHIRAKAWA et al., 2009).

Proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) foram demonstrados por regular a sinalização em muitos sistemas e são de grande importância no câncer, mas as cadeias de heparam sulfato são alvos de muitas moléculas efetoras, como moléculas de adesão, inibidores de proteases, fatores de crescimento, receptores, enzimas de degradação e proteínas da MEC (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

Assim além da importância dos PGHS em si, também a sua enzima de degradação, a heparanase, tem uma função biológica importante.

A heparanase é uma endo- β -glucuronidase, a qual possui a capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas intrassacarídicas do heparam sulfato (HS) (constituente dos proteoglicanos de matriz extracelular e superfície celular) gerando fragmentos de HS (JUNG et al., 2016; ROY; MARCHETTI, 2009; SANDERSON et al., 2005).

Estes fragmentos possuem atividade biológica, e podem exercer papéis tais como fatores de crescimento, quimiotáticos e agentes angiogênicos (Figura 13); também envolvem a formação de oligossacarídeos, que possuem atividade biológica desencadeando proliferação celular, diferenciação celular, e angiogênese (SANDERSON et al., 2005).

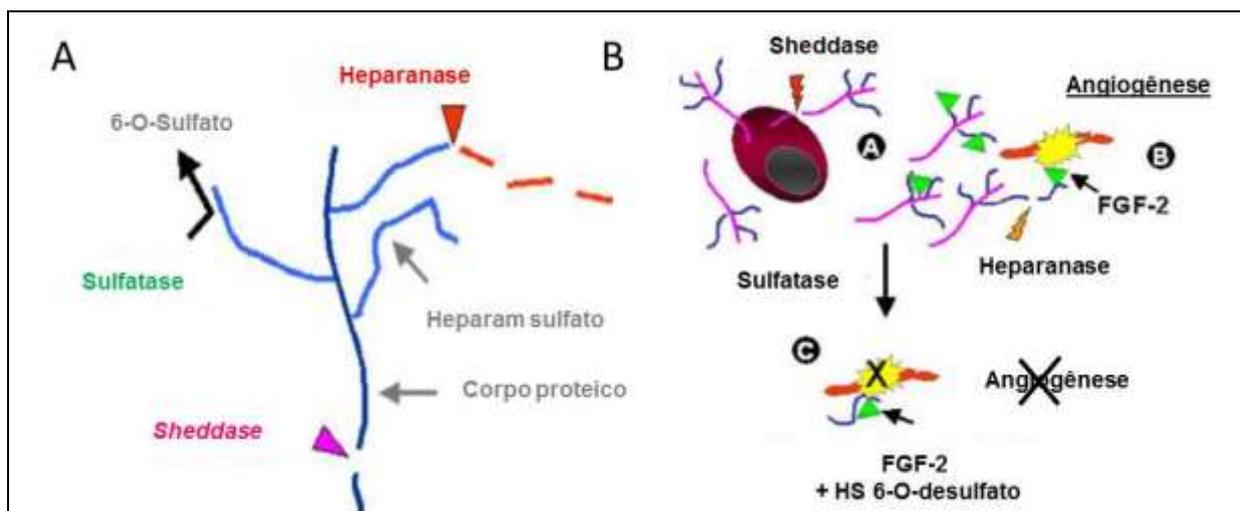


Figura 13. Diferentes formas de remodelação do PGHS. (A) A atividade de *sheddases* (cliva esqueleto proteico); Heparanase (cliva GAG) e Sulfatase (remove sulfato da posição 6-O). (B) Modelo de consequências biológicas de remodelação do heparam sulfato dentro do microambiente tumoral. (B.A) Ação de *sheddase*, liberando o domínio extracelular de sindecam-1; (B.B) A heparanase produzida pela célula tumoral ou do estroma, clivando a cadeia de heparam sulfato; (B.C) Sulfatases extracelulares, remove grupos 6-O-sulfato de heparam sulfato. FONTE: Figura adaptada: (SANDERSON et al., 2005).

As células endoteliais e células tumorais apresentam heparanase e clivam o sindecam-1, expondo os sítios de ativação de VEGF, e assim estimulam a migração celular. Todo esse processo conduz a angiogênese, invasão de células tumorais e subsequente metástase (JUNG et al., 2016).

A heparanase também desempenha um papel de quimioresistência, sendo identificada após vários tipos de tratamento em diversos cânceres, inclusive após extensa quimioterapia, desta maneira autores propõem que inibidores de heparanase podem melhorar a eficácia de fármacos antitumorais já utilizados (HAMMOND et al., 2014).

Um inibidor de heparanase foi utilizado em ensaios clínicos de fase II/III em pacientes com melanoma metastático. Este inibidor preveniu a angiogênese e o crescimento tumoral, bloqueando interações específicas com FGF-1, FGF-2 e VEGF (FERRO et al., 2007). A heparanase pode contribuir pra a invasão celular do melanoma liberando fragmentos de HS, estes que possuem propriedades angiogênicas (ROY; MARCHETTI, 2009).

3.2.2.4 Ácido hialurônico

Como discutido anteriormente, o ácido hialurônico (AH) é o único glicosaminoglicano não sulfatado e que não forma proteoglicano. AH é sintetizado por hialuronam sintetases (HAS 1-3), estas enzimas são proteínas integrais de membrana plasmática, diferentemente da síntese de glicoconjugados de uma forma geral. A síntese do AH não utiliza um esqueleto proteico como precursor para glicosilação, sendo então o único GAG que está presente na forma de polissacarídeo livre. AH é composto de 2000-25000 unidades repetitivas de dissacarídeos de *N*-acetilglicosamina e ácido glucorônico; com massa molecular de 10^5 a 10^7 Da (MEYER, 1958; ROGER H.J., 1961; SIRONEN et al., 2011).

AH é um polissacarídeo encontrado na matriz extracelular, especialmente fazendo ligações entre as células e a MEC. Os receptores para AH presentes nas células são os CD44, CD168/RHAMM (receptor para a motilidade mediada por ácido hialurônico), TLR-4 e outros. A interação de AH e seus receptores de superfície celular, inicia a transdução de sinais intracelular e assim forma a base para a homeostase dos tecidos e motilidade celular, alterando a fisiologia celular. Estas ligações contribuem para que as células obtenham motilidade. Mas no processo tumoral, atua favorecendo a progressão do tumor pela indução da motilidade, invasão celular, proliferação celular, produção de fatores de crescimento, resistência a multidrogas (MDR) e a transição epitelial-mesenquimal (EMT) (Figura 14) (SIRONEN et al., 2011; THEOCHARIS et al., 2016).

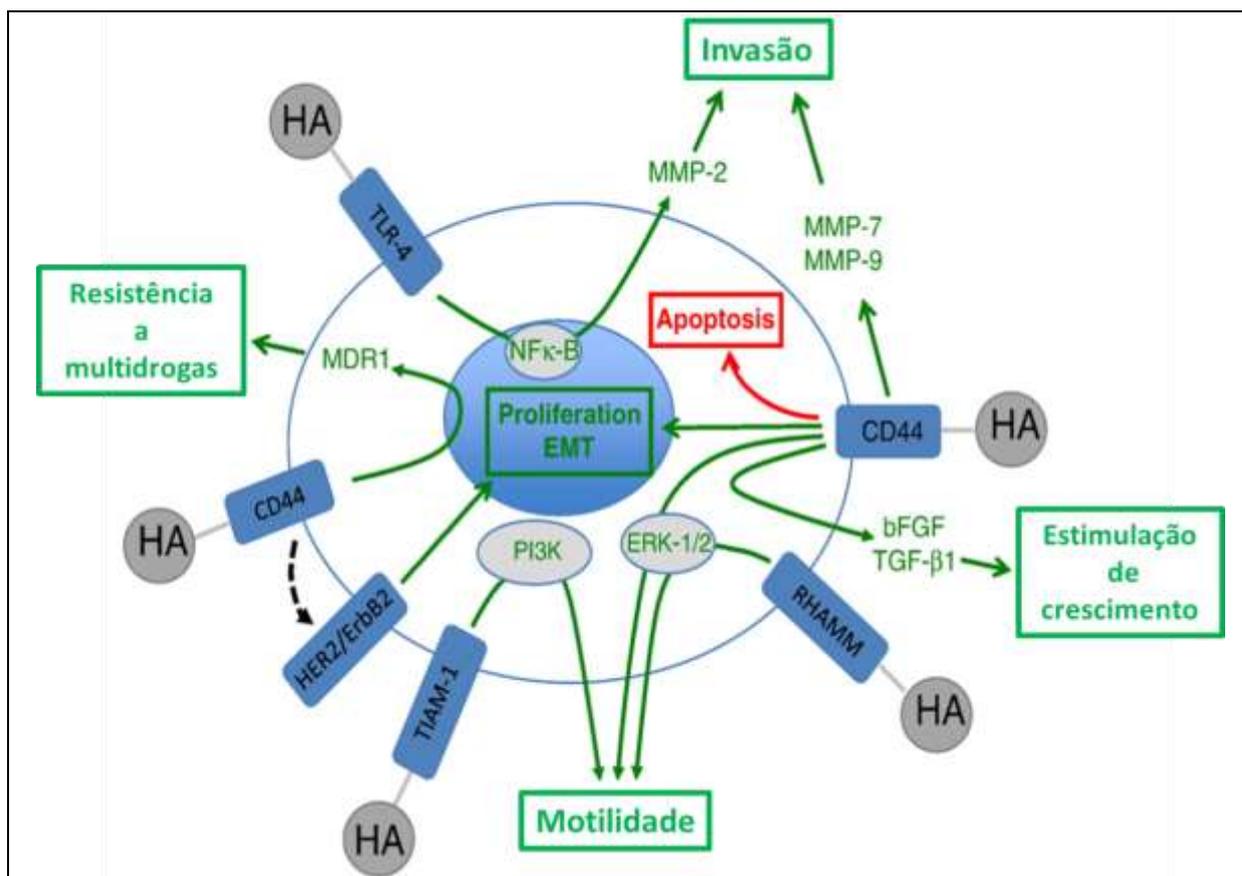


FIGURA 14. Regulação das funções de células tumorais por interações do ácido hialurônico (AH) e receptores. A figura demonstra esquematicamente as interações do AH aos seus receptores de membrana celular; e as consequentes respostas biológicas em tumores. Cor verde: ativação da função; cor vermelha: inibição da função; bFGF: fator de crescimento de fibroblasto básico; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; Her2 / ErbB2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; MDR1: proteína de resistência a multidrogas 1; MMP: metaloprotease de matriz; NFκ-B: fator nuclear κ-B; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; RHAMM: receptor de motilidade mediada por AH; TIAM-1: receptor de proteína de invasão e metástase de linfoma de célula T 1; TGF-β1: do fator de crescimento transformante β-1; TLR-4: Toll-like receptor-4). Fonte: Figura adaptada de SIRONEN et al., 2011.

O receptor transmembrana de ácido hialurônico (CD44) está relacionado com o processo de invasão celular e metástases em tumores. Muitos estudos relatam que quando a célula expressa altas concentrações de AH, a interação entre o receptor CD44 e esse GAG, estimula a migração celular e a formação de nódulos pulmonares, ou metástase, o que está associado na clínica ao mau prognóstico para pacientes com câncer (KIM et al., 2011; KUDO et al., 2004; SIRONEN et al., 2011).

A inibição da síntese de AH e a baixa expressão de enzimas que participam de sua biossíntese (HAS-2 e -3) também foram relacionadas ao melhor prognóstico. O acúmulo de AH em células tumorais está relacionada à progressão do crescimento e espalhamento tumoral (KULTTI et al., 2009).

AH pode ser degradado em menores fragmentos, por enzimas chamadas hialuronidases. Estas enzimas são sintetizadas principalmente por fibroblastos cuja expressão é elevada durante os processos inflamatórios. Mas os processos tumorais demonstraram produzir hialuronidases, assim degradam AH no ambiente tumoral. Também estes fragmentos de AH estimulam respostas angiogênicas, incluindo proliferação e migração de células endoteliais (SAMPSON et al., 1992; VOELCKER et al., 2008).

3.2.3. INTEGRINAS

Integrinas são uma família de receptores transmembranares (HAMIDI; PIETILÄ; IVASKA, 2016), formadas por um heterodímero composto por subunidades α e β , que medeiam interações célula-célula e, principalmente, ligações células à MEC. Por exemplo, a integrina $\alpha_5\beta_1$ é conhecida como o receptor celular para a fibronectina (BARCZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010).

Através desta ligação bidirecional entre a MEC e o citoesqueleto, as integrinas promovem linhas de comunicação entre a célula e seu microambiente, para coordenar a polimerização do citoesqueleto de actina, e assim regularem importantes processos biológicos como proliferação, expressão de genes, sobrevivência e motilidade celular (HAMIDI; PIETILÄ; IVASKA, 2016; LEGATE et al., 2009).

As células tumorais utilizam-se desse mecanismo para promover a invasão celular e sobrevivência no ambiente tumoral, criando assim um microambiente propício para o crescimento tumoral e consequente metástase. Adicionalmente, a interação entre as integrinas, fatores de crescimento e receptores de fatores de crescimento aumenta a complexidade dos sinais, controlando o destino celular (HAMIDI; PIETILÄ; IVASKA, 2016; IVASKA; HEINO, 2011).

Além disso, outras moléculas transmembrana como os proteoglicanos de heparan sulfato, os sindecans, também apresentam funções moduladoras mediadas por integrinas, como a adesão e migração (LEGATE et al., 2009).

Vale destacar que a ligação das integrinas com a MEC, recruta proteínas adaptadoras que fazem a associação da integrina ao citoesqueleto, formando então as placas de adesão na membrana plasmática (“clusters de integrina”) (HAMIDI;

PIETILÄ; IVASKA, 2016). Dentre várias proteínas adaptadoras, destaca-se a talina, a qual é recrutada para a região *carboxi* intracelular da integrina, induzindo uma alteração conformacional do domínio extracelular da integrina, levando a ativação do receptor e aumento de afinidade com os ligantes da MEC (sinalização de dentro para fora). (HAMIDI; PIETILÄ; IVASKA, 2016).

A desregulação da adesão celular à MEC via integrinas, é observada nos estágios da tumorigenicidade, resultando em hiperproliferação, invasão local, disseminação metastática e colonização para órgãos distantes (HAMIDI; PIETILÄ; IVASKA, 2016).

3.2.4. METALOPROTEASES

Metaloproteases (MMPs) são caracterizadas por serem uma grande família de enzimas, dependentes de zinco, que catalisam a quebra hidrolítica das proteínas em peptídeos ou aminoácidos, podendo ser do tipo endopeptidase (atuam no interior da cadeia polipeptídica). Atualmente são conhecidas pelo menos 23 MMPs, as quais clivam diferentes substratos, conforme ilustrado na figura 15 (RUCCI; SANITÀ; ANGELUCCI, 2011).

As metaloproteases (MMPs) são normalmente classificadas de acordo com seu substrato específico, similaridade sequencial e domínio organizacional. As MMPs são classificadas em seis grupos: Colagenases; Gelatinases; Estromelinas; Matrilisinas; MMPs da membrana; outras MMPs (THEOCHARIS et al., 2016).

As MMPs auxiliam na homeostase celular, pois as células realizam síntese, degradação e remodelamento da MEC, mas os componentes da MEC precisam ser clivados para que ocorra a liberação de fatores de crescimento, para a sinalização celular e para a motilidade celular em processos normais nos tecidos. Estes processos são complexos e precisam ser bem regulados para manter a homeostase dos tecidos, especialmente para respostas a lesões (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

MMPs estão entre as maiores famílias de proteases implicadas na biologia celular do câncer. As MMPs representam o maior grupo de proteases que regulam a MEC, por isso é uma das classes mais estudadas nos processos de desenvolvimento do tumor (THEOCHARIS et al., 2016), pois contribuem para a

progressão tumoral preparando a via para as células tumorais migrarem, invadirem e espalharem para áreas distantes secundárias, formando as metástases (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

Quando as MMPs atuam no microambiente local, ou nicho, de uma célula tumoral tem papel muito importante no seu desenvolvimento, sendo a MEC desregulada durante esse processo. Esta desregulação gera a progressão tumoral, pois atua diretamente na proliferação celular e metástase; mas também desregula o comportamento das células do estroma e então facilitam a angiogênese e a inflamação associadas ao tumor, gerando assim um microambiente tumorigênico (LU; WEAVER; WERB, 2012).

Vale lembrar que as células de melanoma expressam três tipos de metaloproteases: a MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B) e MT1-MMP (metaloprotease transmembrana 1 ou MMP-14) (MENG et al., 2008), como por exemplo em melanoma humano, a expressão da MMP-2, foi relacionada com a progressão tumoral, e é considerada um marcador de prognóstico, pois se encontra aumentada na progressão tumoral (VÄISÄNEN; KALLIOINEN; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2008)

A interação entre o microambiente tumoral, células e MEC, bem como seus moduladores (MMPs, p.ex.) tornaram-se alvos de pesquisas nos últimos anos, sendo então voltadas para a diminuição de metástases em pacientes e assim conseguir um avanço no tratamento, prolongando a vida do paciente livre de tumor e reduzindo as metástases; onde as MMPs são importantes neste processo de remodelação da MEC (MORO; MAUCH; ZIGRINO, 2014).

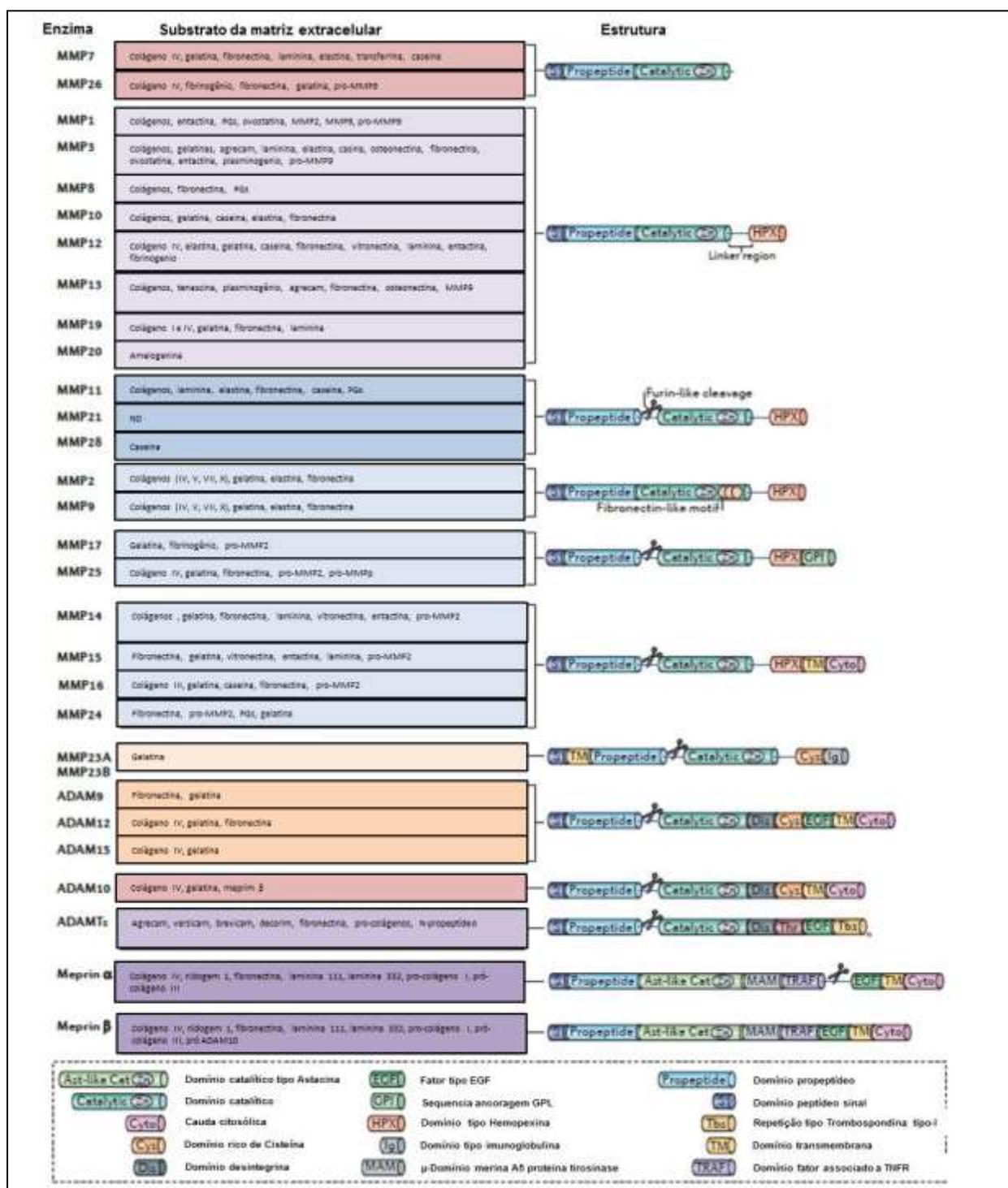


FIGURA 15. Estrutura e substratos de metaloproteases. As metaloproteases clivam componentes da matriz extracelular (MEC) e são produzidas quer como enzimas solúveis ou ancoradas à membrana plasmática. MMPs são compostos de vários domínios funcionais compartilhadas: domínio sinal de peptídeo, domínio de propeptídeo, domínio catalítico e de domínio hemopexina-like (exceto MMP7, MMP23 e MMP26). Metaloproteases compreendem várias famílias, sendo as enzimas metzincin, que incluem as metaloproteases de matriz (MMPs), adamalinas [que inclui Adams (uma desintegrina e metaloproteases) e ADAMTS (Adams com um motivo de trombospondina)] e astacinas (incluindo meprinas). As proteinases são classificadas de acordo com sua porção química que participa da hidrólise (aspártico, cisteína, treonina, serina e metaloprotease). Figura adaptada: (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

Esta remodelação da MEC em condições patológicas gera a associação de fibroblastos associados ao câncer, que quando ativados resultam na desregulação da expressão de proteases e, também, de elementos da MEC. Consequentemente ocorrem a transformação e a hiperplasia de células no ambiente tumoral, afetando assim os sistemas imunológico e vascular. Desta maneira estas transformações que desregulam a MEC, geram poros nos vasos, e a invasão celular com consequente metástase para locais distantes. Nestes novos locais, expressam enzimas de remodelamento da MEC e criam seus novos nichos metastáticos (LU; WEAVER; WERB, 2012) (Figura 16).

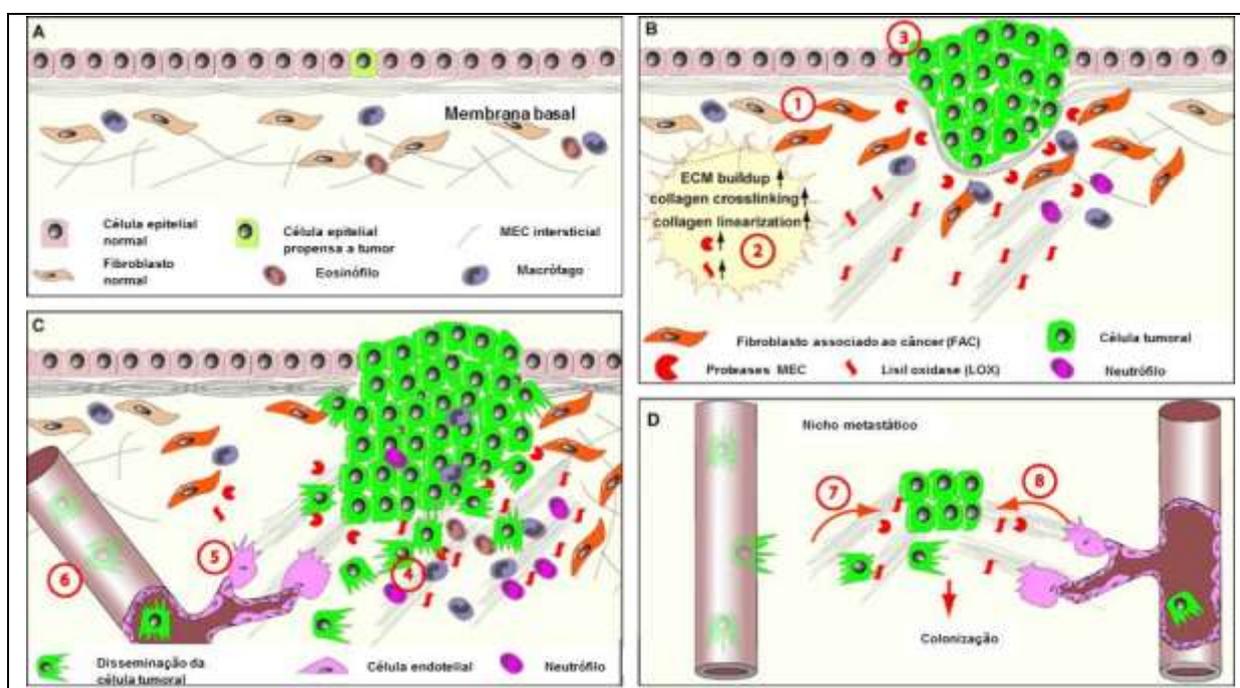


FIGURA 16. MEC anormal estimula a progressão do câncer. (A) a remodelação da MEC é controlada para garantir a homeostase e funções dos órgãos, para a integridade dos tecidos e um microambiente saudável. (B) Em condições patológicas, os tecidos iniciam uma série de eventos tumorigênicos. Assim ocorre a (1) geração de fibroblastos associados ao câncer (FACs) ativados, o que contribui para a (2) geração de MEC anormal e desregulação da MEC e da expressão de proteases. Com a MEC alterada ocorrem impactos sobre as células circundantes, como a epitelial, endotelial e células do sistema imunológico e do estroma, (3) promovendo assim a transformação celular e hiperplasia epitelial. (C) Em tumores avançados (4) as células do sistema imunológico são recrutadas para o local do tumor para promover a progressão; além disso, (5) a MEC desregulada afeta o sistema vascular e promove a angiogênese associada ao tumor. Com esta desregulação da MEC, facilita (6) a abertura de poros nos vasos, e a invasão celular com consequentes metástases para locais distantes, onde as células cancerosas deixam os vasos (D), e invadem tecidos (7), assim expressam enzimas de remodelamento da MEC e criam um nicho metastático local. Passado um período de dormência, (8) as moléculas anormais da MEC sinalizam fatores angiogênicos e iniciam o crescimento destas células (como na fase 5) e assim promovem o rápido crescimento das células cancerosas e uma expansão de micrometástase para macrometástase. Figura adaptada: (LU; WEAVER; WERB, 2012).

MMPs são inibidas e reguladas pelas TIMPs (inibidores de tecidos de metaloproteases), e estas são usadas como ferramenta no combate ao câncer (BREW; DINAKARPANDIAN; NAGASE, 2000).

Jung e colaboradores (2014) demonstraram que aumento da expressão de TIMP-1 e TIMP-2 e a diminuição das MMP-2 estão relacionadas, pois reduziram a metástase experimental de melanoma e induziram apoptose das células tumorais.

Meng e colaboradores (2008), em uma revisão, descrevem a importância das MMPs, nos processos de invasão e adesão celular nas metástases, como degradadores de MEC. Muitos estudos clínicos demonstraram que a diminuição das MMPs causou benefícios clínicos comparados a terapias convencionais. Citam RECK (*reversion- inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*) como sendo outro inibidor de MMPs, inibindo assim os processos tumorais e metástases. Desta maneira RECK é um regulador da angiogênese no desenvolvimento tumoral (FIGURA 17).

Quando a expressão de RECK é elevada, a atividade das MMPs fica reduzida ao ponto de remodelar a MEC, assim inibe a capacidade dos vasos sanguíneos preexistentes produzirem novos capilares e formar novos vasos (angiogênese) (MENG et al., 2008).

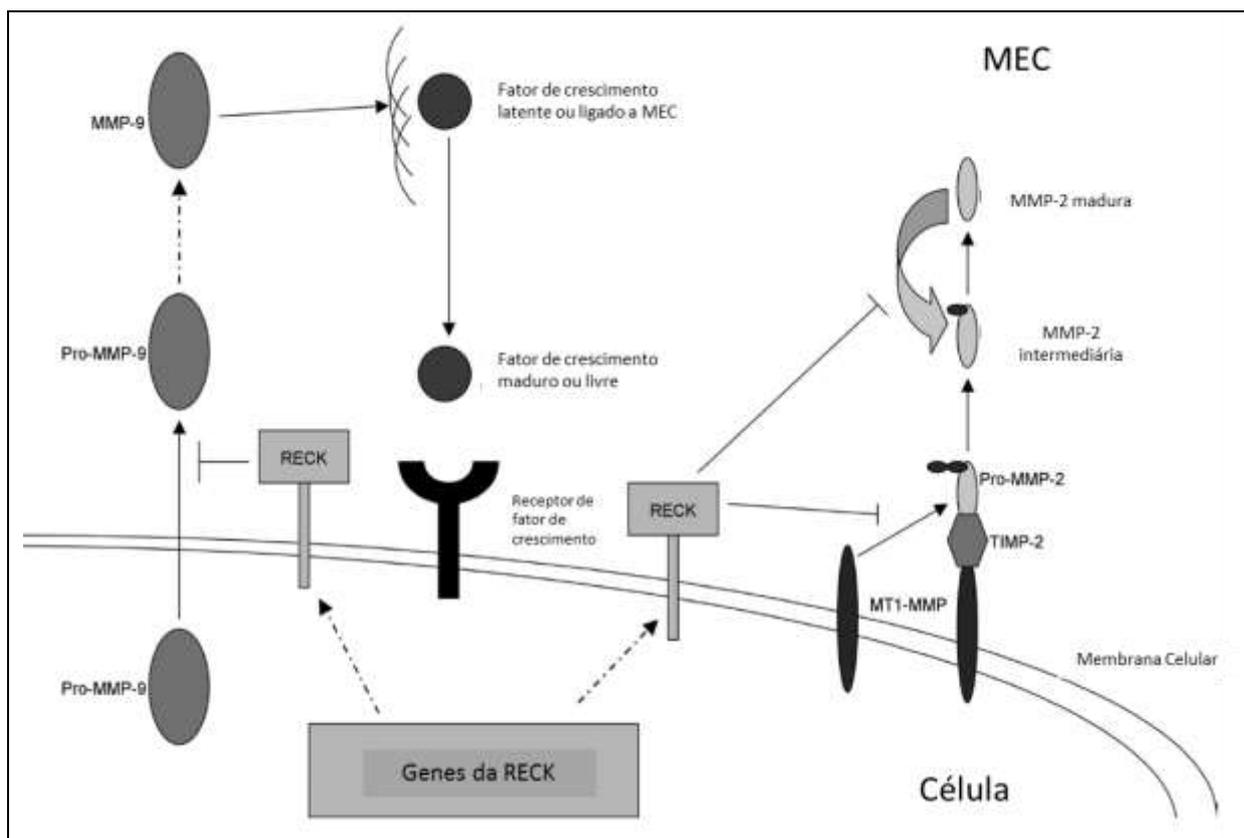


FIGURA 17. Mecanismos de Inibição das MMPs pela RECK. A figura acima ilustra, de forma esquemática, a ação de RECK. Observe que ela interfere com MMP9, por inibir a secreção de sua forma precursora (Pró-MMP-9). Ainda, interfere com MMP2 e MT1-MMP, por inibir a ação de MT1-MMP em converter a forma zimógena de MMP2 para a forma ativa. FONTE: Figura adaptada de: MENG et al., 2008.

Existem outros mecanismos celulares que envolvem o controle da invasão celular, migração e desenvolvimento tumoral como a atividade biológica das Galectinas.

3.2.5. GALECTINAS

Lectinas são proteínas ligantes de carboidratos que reconhecem glicoconjugados (glicoproteínas e glicolípídeos), presentes na superfície celular e na matriz extracelular. Esta ligação ocorre através de um domínio altamente conservado de reconhecimento de carboidratos (CRD – *Carbohydrate Recognition Domain*) (LIU; RABINOVICH, 2005).

Galectinas são uma família de lectinas, que possuem domínio CRD com cerca de 130 resíduos de aminoácidos e apresentam afinidade de ligação a β -galactosídeos (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; LIU; RABINOVICH, 2005; THIJSEN et al., 2015).

As galectinas são classificadas conforme o número e a organização dos seus domínios CRD (FIGURA 18). Como base nessa organização as galectinas são agrupadas em três subfamílias (AHMED; ALSADEK, 2015; DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; LIU; RABINOVICH, 2005):

- Grupo protótipo (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15) que contém um único domínio CRD;
- Grupo *tandem repeat* (galectina-4, -6, -8, -9 e -12) com dois domínios CRD diferentes, ligados a um polipeptídeo com até 70 aminoácidos;
- Grupo químera, representado pela galectina-3, com um domínio CRD ligado a um domínio N-terminal através de uma cadeia peptídica rica em prolina e glicina.

A galectina-3 é encontrada em diferentes tipos celulares, pode estar intracelularmente, tanto no núcleo, quanto no citoplasma, mitocôndria e em compartimentos vesiculares; ou extracelularmente, na superfície celular e no espaço extracelular. Através de interações específicas, a galectina-3 apresenta vários efeitos biológicos como reações com o sistema imunológico, transformação tumoral e metástase (AHMED; ALSADEK, 2015; DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006) (FIGURA 19).

Estudos demonstram que o acúmulo de galectina-3 é um mecanismo de adaptação para a sobrevivência de células tumorais em hipóxia e em microambientes tumorais privados de nutrientes sendo, portanto um alvo para novas terapias (IKEMORI et al., 2014).

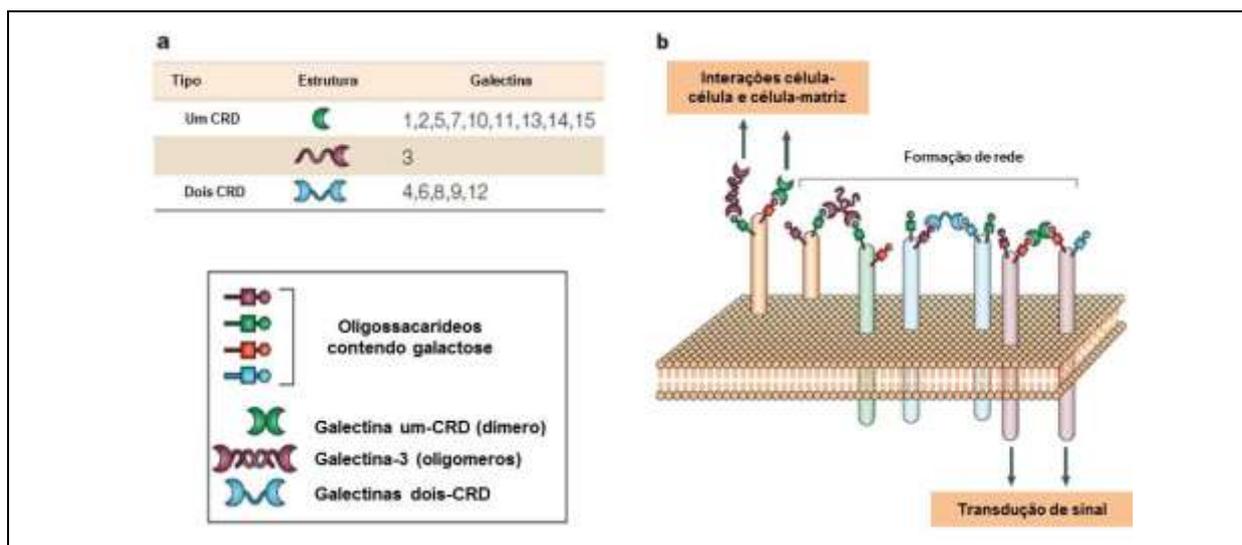


FIGURA 18. Galectinas. A figura acima ilustra (A) Diferentes tipos de galectinas, conforme o número e a organização dos CRDs (domínio de reconhecimento de carboidratos). Muitas galectinas são bivalentes ou multivalentes quanto a sua capacidade de ligação a carboidratos. Algumas são dímeros (galectinas com dois domínios CRD) ou oligômeros, como a galectina-3. (B) As galectinas podem interagir com glicoconjugados da superfície celular; ou podem se ligar a glicoconjugados e desencadear uma cascata de eventos de sinalização intracelular; várias galectinas podem se unir e formar uma rede com os glicoconjugados; ou podem unir duas células, através de pontes para a matriz extracelular. Fonte: Figura adaptada: (LIU; RABINOVICH, 2005).

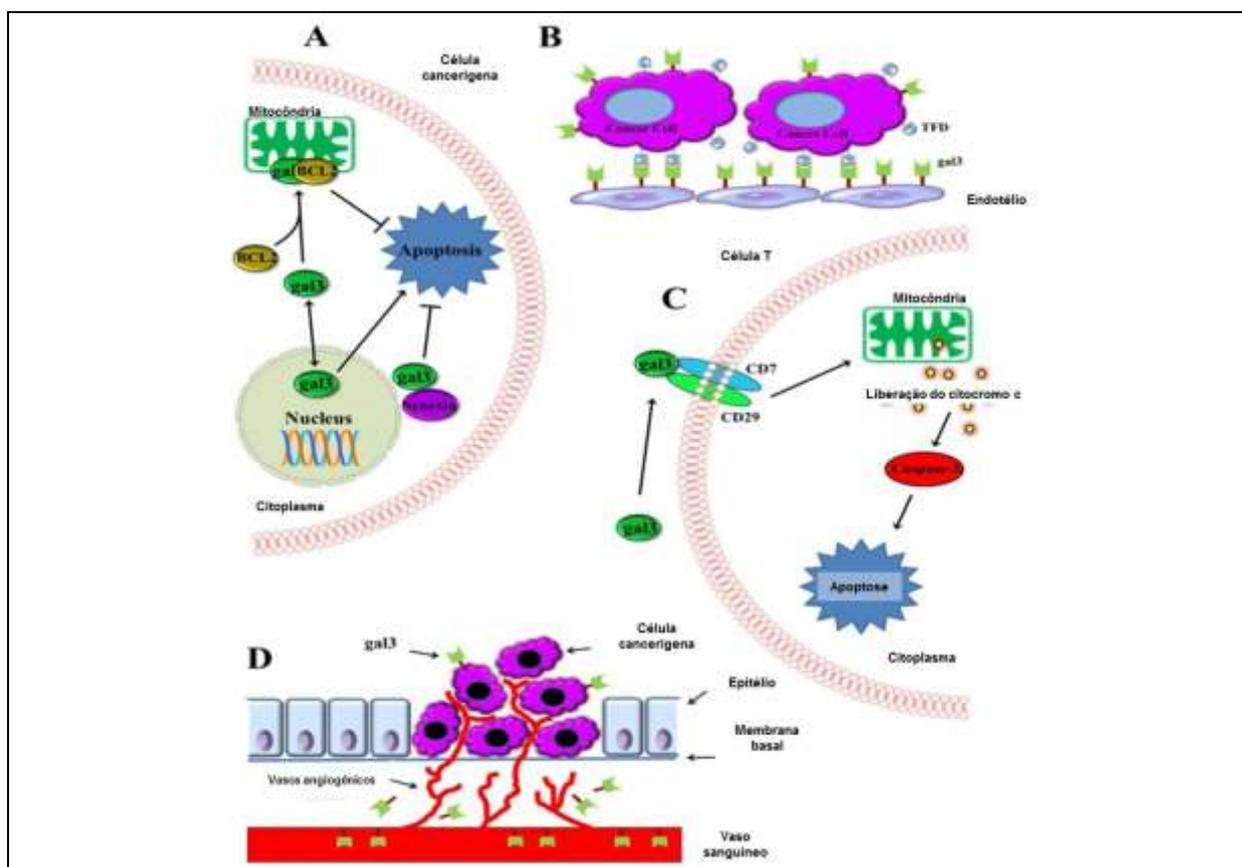


FIGURA 19. Representação esquemática das funções da galectina-3 (Gal-3). (A) Intracelular e (B-D) Extracelular. (A). Gal-3 quando localizada no núcleo é apoptótica, enquanto ela citoplasmática é anti-apoptótica. (B). Gal-3 promove interações entre células tumorais endoteliais. (C). Gal-3 promove a apoptose celular. (D). Gal-3 promove a angiogênese das células do tumor. Fonte: Figura adaptada: (AHMED et al., 2011).

A transformação maligna das células cancerígenas está associada com a alta expressão de galectina, principalmente galectina-1 e galectina-3. Levando a uma correlação direta do aumento da galectina com o mau prognóstico tumoral para pacientes com câncer (THIJSEN et al., 2015).

A galectina-3 pode contribuir para a tumorigênese e a progressão tumoral através de diferentes mecanismos, como: 1) interações com proteínas RAS oncogênicas (KRAS), ativação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e RAF1, modulando a expressão do gene; 2) alterar o ciclo celular, regulando negativamente ciclina-E e ciclina-A, e regulando positivamente a expressão de inibidores de p21 e p27; 3) atuar na superfície celular como molécula de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, e está envolvida com a formação do tumor e adesão das células tumorais no epitélio durante a metástase; 4) na superfície celular também pode contribuir para indução de apoptose, pode regular migração e invasão, envolvendo ativação ou expressão de integrinas; 5) ter atividade angiogênica, e promover a formação de novos vasos capilares; 6) intracelularmente, ter função antiapoptótica e protege as células da *anoikis* (LIU; RABINOVICH, 2005; RADOSAVLJEVIC et al., 2012) (Figura 20).

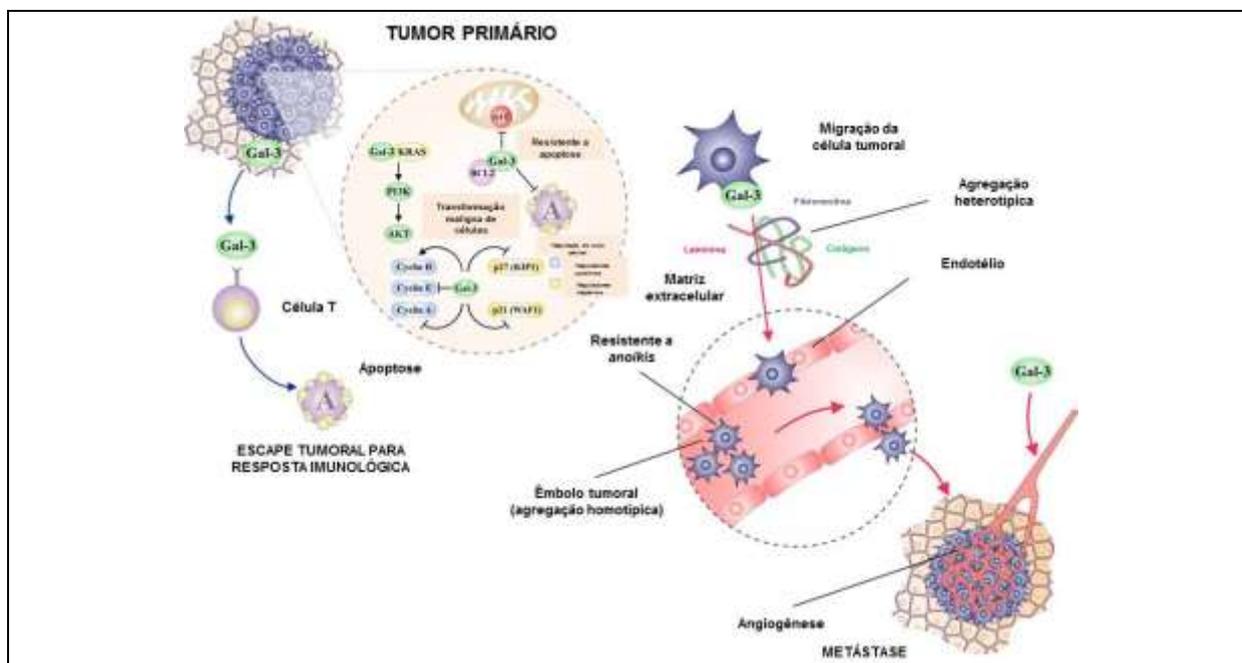


FIGURA 20. Funções da galectina-3 no desenvolvimento tumoral associado à transformação e progressão tumoral. A galectina-3 pode contribuir para a tumorigênese no tumor primário através de modulação da expressão gênica; e também na alteração do ciclo celular. Pode também atuar como molécula de adesão celular, estando envolvida nos êmbolos tumorais e na ligação da célula durante a metástase (migração e invasão). Galectina-3 intracelular tem atividade anti-apoptótica, protegendo as células de morte por *anoikis*. Mas na superfície ela contribui para que a célula tumoral escape do sistema imunológico. Também regula a migração e invasão, envolvendo ativação de integrinas. Galectina-3 tem atividade angiogênica. Figura adaptada: (RADOSAVLJEVIC et al., 2012).

3.3. POLISSACARÍDEOS DE COGUMELOS COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

Nos últimos anos, vários cogumelos comestíveis vêm despertando o interesse das pessoas no meio científico (XU et al., 2016).

Pleurotus eryngii é uma espécie de cogumelo comestível (Figura 21), de ampla distribuição geográfica, conhecido por seu notável sabor, alto valor nutricional e numerosos usos medicinais (STAJIC; VUKOJEVIC; DULETIC-LAUŠEVIC, 2009).

A literatura relata que cogumelos do tipo *Pleurotus eryngii* possuem potencial farmacológico e terapêutico, pois apresentam muitas atividades biológicas como: antitumoral, antiviral, antioxidante, antimicrobiana, antileucêmica, hipolipidêmica, imunomoduladora e outras. A maioria destas atividades biológicas é atribuída ao efeito exercido pelos polissacarídeos que compõem estes cogumelos (FU; LIU; ZHANG, 2016).

Polissacarídeos são moléculas bem exploradas como agentes terapêuticos e são considerados um avanço na terapia antitumoral dos últimos anos (PATEL; GOYAL, 2012), em especial os polissacarídeos de *Pleurotus eryngii*, os quais são extraídos, purificados e caracterizados por diferentes métodos (ZHANG et al., 2013a)



Figura 21. *Pleurotus eryngii*. A imagem acima demonstra o corpo frutífero do cogumelo *Pleurotus eryngii* e ao lado o polissacarídeo em pó liofilizado. Fonte: (KAWAI et al., 2014).

Polissacarídeos obtidos de *Pleurotus eryngii* apresentam atividade antitumoral (FU; LIU; ZHANG, 2016), como demonstrado pelo heteropolissacarídeo composto principalmente de glucose, através da redução da viabilidade das células tumorais de uma forma dose-dependente (MA et al., 2014; REN et al., 2016). Muitos autores relacionam o efeito antitumoral (de mais de 30 tipos de câncer, incluindo o melanoma) com a citotoxicidade (IVANOVA et al., 2014; SRINIVASAHAN; DURAIRAJ, 2015) e indução de apoptose, bem como com a diminuição da

viabilidade (SHANG et al., 2011) e da proliferação celular (ALE et al., 2011; HUNG et al., 2012).

Já por outro lado, outros autores discordam dessa ideia, e demonstram que heteropolissacarídeos compostos de manose, galactose e glucose de *Pleurotus ostreatus* tem demonstrado inibir as células tumorais (células Hela), mas sem apresentar citotoxicidade (TONG et al., 2009), podendo atuar indiretamente e modular o sistema imunológico (MENG; LIANG; LUO, 2016), e assim com redução de efeitos colaterais (NOVAES et al., 2011).

Outros polissacarídeos não tóxicos, e também os complexos de polissacarídeos-proteínas foram descritos com atividade antitumoral (ZONG; CAO; WANG, 2012). A atividade antimelanoma foi também demonstrada por extrato de etanol de *Pleurotus ferulae*, inibindo a migração celular e proliferação (WANG et al., 2014b). Estes polissacarídeos são moléculas promissoras e em alguns casos já estão sendo usados como adjuvantes em cirurgia, quimioterapia e radioterapia, demonstrando suavizar os efeitos colaterais e, portanto, induzindo a melhora na qualidade de vida do paciente (WASSER, 2014).

Resultados *in vitro*, com células de melanoma (B16-F10), que antecederam o desenvolvimento deste trabalho, evidenciaram que o P1 não exerce ação citotóxica bem como alterações no padrão morfológico desta linhagem. Mas de forma promissora, este polissacarídeo apresentou ação sobre a invasão celular (Figura 22), com diminuição de 42% (BISCAIA, 2012).

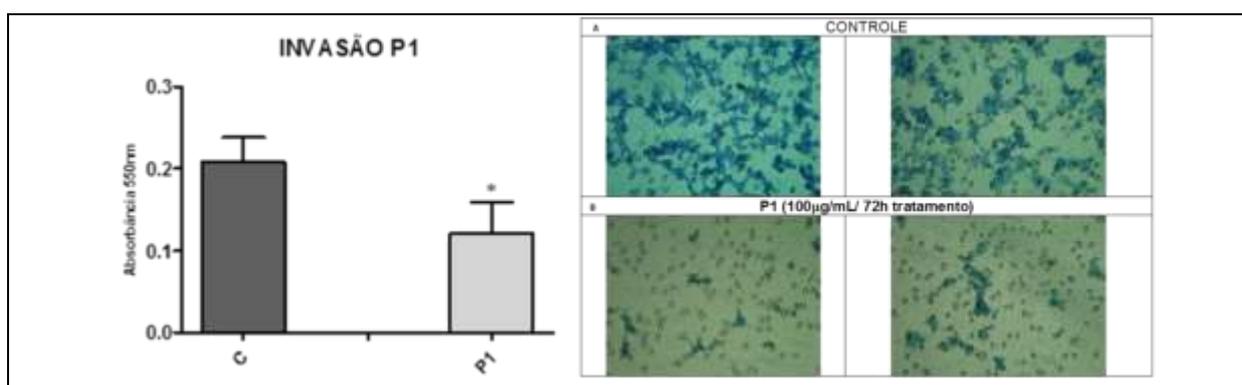


Figura 22. Avaliação da interferência do polissacarídeo P1 na invasão celular. Células B16-F10 foram expostas, a 100µg/mL do polissacarídeo, por 72 horas, a seguir as células foram removidas e submetidas ao ensaio de invasão celular, utilizando placa de *Transwell*, por um período de 20 horas. Empregou-se como molécula quimioatraente a fibronectina, na concentração de 10µg/mL. **(A)** Controle; **(B)** P1. Fonte: (BISCAIA, 2012).

Estes resultados promissores motivaram a prosseguir com estudos sobre o papel biológico *in vitro* e a ação antitumoral *in vivo*, deste composto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. POLISSACARÍDEO - P1

O polissacarídeo utilizado para este estudo foi extraído do cogumelo comestível chamado *Pleurotus eryngii* (Figura 21), também conhecido como “King Oyster” ou Ostra Rei, e aqui este polissacarídeo é denominado de P1.

O P1 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcello Iacomini, do Departamento de Bioquímica da UFPR e pela Prof^a. Dr^a. Elaine Carbonero do Departamento de Química da UFG. Foi obtido a partir do cogumelo *Pleurotus eryngii*, fornecido pela Empresa Urakami, São José dos Pinhais/PR.

Todos os processos de isolamento, purificação e caracterização foram realizados pelos Professores citados acima, e então o polissacarídeo purificado nos foi fornecido liofilizado.

Os dados de metilação e da análise espectrópica por RMN e HSQC-DEPT, obtidos pela Prof^a. Dr^a. Elaine Carbonero, permitiram analisar quimicamente P1. Os resultados estão ilustrados na Tabela 1, onde se pode verificar que apresenta uma cadeia principal composta por D-Galp e 3-O-metil D-Galp, ambas α -(1→6)-ligadas, as quais podem apresentar-se substituídas em O-2 por β -D-Manp. Portanto, P1 é uma manogalactana parcialmente metilada, composta de monossacarídeos de manose, galactose e 3-O-metil-galactose (Figura 23).

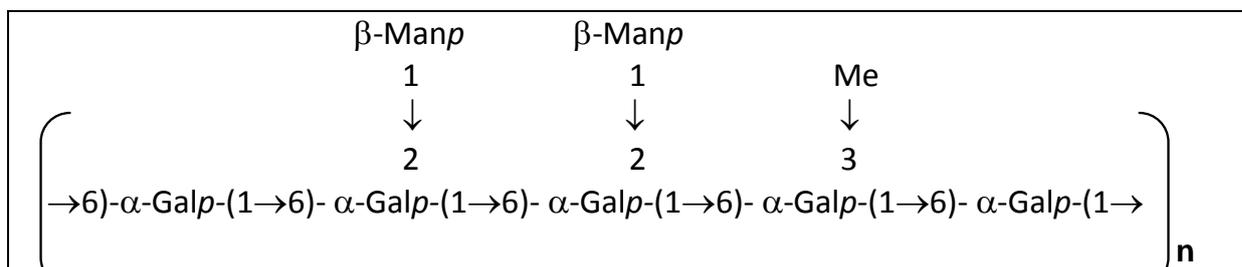


Figura 23. Representação da estrutura química do polissacarídeo P1. Fonte: Elaine Carbonero.

UNIDADES		1	2	3	4	5	6		-O-CH ₃
							6a	6b	
→2,6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo A)	¹³ C	101.14	79.84	71.36	72.44	71.76	69.87		
	¹ H	5.142	3.96	3.98	4.02	4.18	3.72	3.89	
→2,6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo B)	¹³ C	101.46	79.79	71.36	72.56	71.78	69.87		
	¹ H	5.137	4.00	4.00	4.07	4.14	3.72	3.89	
→2,6)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→ (Resíduo C)	¹³ C	100.92	78.69	81.02	68.83	71.70	70.00		59.5
	¹ H	5.126	4.02	3.68	4.30	4.20	3.73	3.88	3.48
→6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo D)	¹³ C	100.83	71.22	72.34	72.06	71.70	69.45		
	¹ H	4.998	3.87	3.89	4.10	4.20	3.69	3.91	
→6)-α-D-Galp-(1→ (Resíduo E)	¹³ C	101.04	71.22	72.27	72.00	71.70	69.45		
	¹ H	4.994	3.82	3.91	4.05	4.20	3.69	3.92	
→6)-3-O-Me-α-D-Galp-(1→ (Resíduo F)	¹³ C	100.68	70.22	81.82	68.36	71.56	69.59		59.2
	¹ H	4.990	3.88	3.55	4.28	4.17	3.70	3.90	3.46
β-D-Manp-(1→ (Resíduo G)	¹³ C	104.35	73.24	75.88	69.76	79.05	64.00		
	¹ H	4.805	4.11	3.64	3.64	3.39	3.77	3.92	
β-D-Manp-(1→ (Resíduo H)	¹³ C	104.44	73.35	75.77	69.76	79.06	64.00		
	¹ H	4.780	4.09	3.67	3.62	3.39	3.78	3.95	

Tabela 1 - Caracterização da manogalactana de *P. eryngii* por ¹³C e ¹H. (A) As atribuições são baseadas nas análises de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC-TOCSY, e HSQC-DEPT. (B) Os valores dos desvios químicos foram registrados com referência ao TMS como padrão interno. Fonte: Elaine Carbonero (dados não publicados).

4.2. ENSAIOS *IN VITRO*

4.2.1. Linhagem celular

Para o cultivo celular foram utilizadas células de melanoma murino, da linhagem B16-F10 (Figura 24), as quais foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) para as análises na UFPR; e do ATCC para as análises no ICESP e no Moffitt, mas as células apresentam as mesmas características independentes do banco.

Estas células foram cultivadas em garrafas (TPP/Corning/Sarstedt), com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (ThermoFisher, 12800-017), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino (ThermoFisher, 12657), 10mM de tampão Hepes (SIGMA, H-4034), 0,25µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina em 0,85% salina (ThermoFisher, 15140-148), 3,7g/L de bicarbonato

de sódio (ThermoFisher, 25080094); e então mantidas em incubadora de CO₂ (Thermo) a 37° C, em atmosfera úmida, com 5% CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

Para a cultura de células, empregadas nos ensaios *in vivo*, não foram utilizados antibióticos.

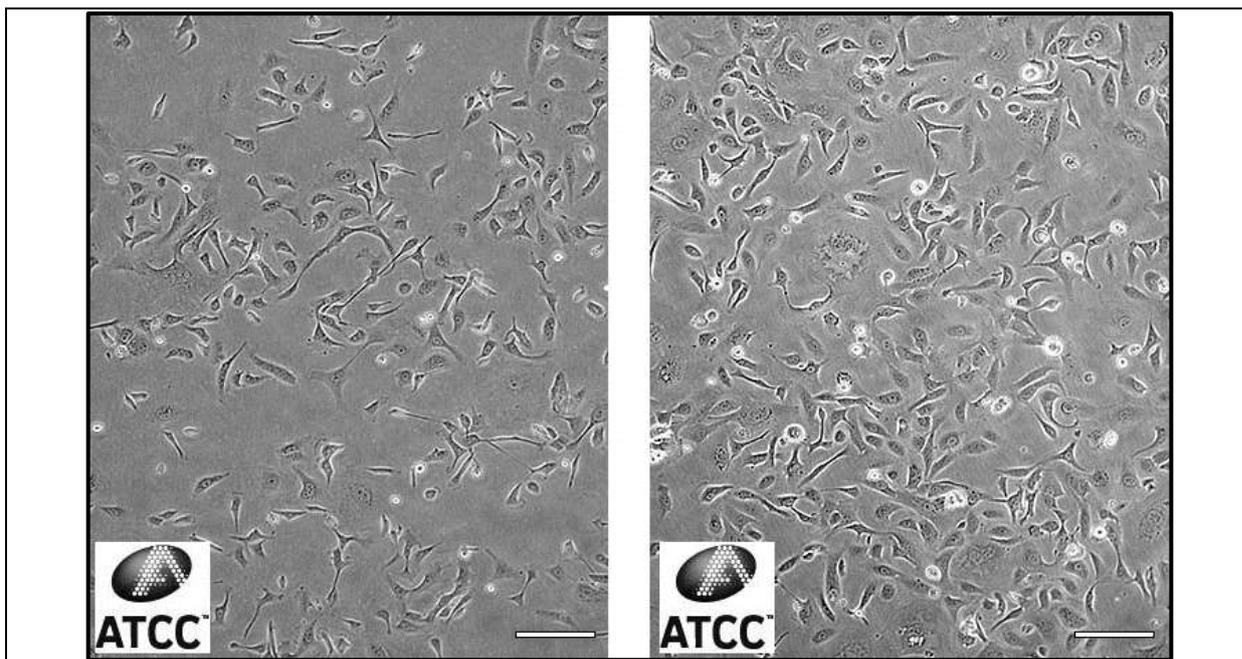


Figura 24. Células B16-F10. A figura acima ilustra as células empregadas no presente estudo (linhagem B16-F10, proveniente de melanoma murino). A esquerda mostra as células em baixa densidade e à direita em alta densidade celular. Note a morfologia das células, contendo células espalhadas e, também, células arredondadas. Barra = 100µm. Fonte: ATCC.

Para o cultivo celular na UFPR:

Foram utilizadas células de melanoma murino, da linhagem B16-F10, que foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estas células foram cultivadas em garrafas (TPP), com meio DMEM – Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (Lonza, CAT 12-604Q, USA), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino (GIBCO, CAT 10270-106, USA), 10mM de tampão HEPES, 0,25µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina em 0,85% salina (Life Technologies, CAT 15140148, USA), e então mantidas em incubadora de CO₂ a 37° C, em atmosfera úmida, com 5% CO₂. Os meios de cultivo foram trocados a cada 2 dias.

Para o cultivo celular na USP:

Foram utilizadas células de melanoma murino, da linhagem B16-F10, que foram obtidas do ATCC. Estas células foram cultivadas em garrafas (Corning), com meio RPMI (GIBCO CAT 31600-026), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino (GIBCO, CAT 10270-106, USA), e então mantidas em incubadora de CO₂ a 37° C, em atmosfera úmida, com 5% CO₂. Os meios de cultivo foram trocados a cada 2 dias.

Para o cultivo celular no Moffitt:

Para os ensaios de luminescência foi utilizado a linhagem B16-F10 que expressa luciferase (B16-F10-luc-G5), derivada de células de melanoma murino B16-F10 por transfecção estável do gene da luciferase expresso a partir do promotor SV40, cedidas pelo laboratório do Dr. Robert Gillies, do Moffitt Cancer Center.

Para o cultivo destas células foi utilizado meio MEM/EBSS (GE CAT SH30024.01), suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino), 1x [100x Non-essential amino acids (Hyclone)], 1x [200mM 100x L-glutamine (Hyclone)], 1mM [100mM Na Pyruvate (Hyclone)], 1x [100x MEM Vitamin solution (Invitrogen)], Penicilin/Streptavidin (5mL para 500mL), Fungizone (1mL para 500mL), Gentamicina (0,5mL para 500mL). Então mantidas em incubadora de CO₂ a 37° C, em atmosfera úmida, com 5% CO₂. Os meios de cultivo foram trocados a cada 2 dias.

Nos ensaios *in vivo*, a linhagem B16-F10-luc-G5, quando em contato com a luciferina injetada intraperitonealmente, oxida a luciferina através da enzima luciferase (presente na célula), na presença de oxigênio molecular da molécula de ATP, gerando oxiluciferina, a qual produz uma luz, chamada bioluminescência.

4.2.2. Migração celular

O protocolo de migração foi baseado no trabalho publicado na revista *Nature Protocols*, para ensaio *scratch in vitro*, segundo Liang, Park e Guan (2007). Brevemente, consiste na formação de um risco (“scratch”) mecânico, em uma monocamada de células aderentes, e então estas células que restaram na placa, tem o estímulo de migrarem até fechar a abertura realizada, para que possam assim reestabelecer as interações célula-célula.

Para este ensaio, 500 células B16-F10 foram plaqueadas em uma placa de 96 poços adaptada para equipamentos de *high content screening* (Corning), e então mantidas em incubadora de CO₂ *overnight*.

No dia seguinte as células foram ou não (controle) tratadas com P1 [100µg/mL, concentração já utilizada em trabalhos anteriores (BISCAIA, 2012), que apresentou redução da invasão celular] e mantidas por 72h para reestabelecerem a completa confluência.

Após o período de tratamento, o meio de cultura dos poços foi removido, adicionou-se mitomicina C (para bloquear a proliferação celular) na concentração final de 10µg/mL diluída em DMEM sem soro fetal bovino, por 2h em incubadora de CO₂.

Ao final do período de incubação, com o auxílio do equipamento *Incucyte Zoom Cell Migration Kit* (ESSEN Bioscience), foram realizados riscos homogêneos no centro dos poços. A seguir, lavaram-se duas vezes as placas com DMEM sem soro fetal bovino, e então o meio da segunda lavagem foi mantido.

A placa foi mantida no equipamento IncuCyte® Live Cell Analysis System (ESSEN Bioscience) por 14 horas.

Imagens de todos os poços foram capturadas a cada 1h, utilizando objetiva 10x. As fotos foram analisadas com o auxílio do programa “T scratch”, permitindo determinar a porcentagem de área aberta do risco, ao longo do tempo.

4.2.3. Citometria de fluxo

As células B16-F10, $1,25 \times 10^5$ por garrafa (Sarstedt), foram mantidas em cultura por 24h sendo a seguir expostas ou não (controle) ao polissacarídeo P1, por 72h, na concentração 100µg/mL.

Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% (EMS, cat15714) em PBS (tampão fosfato-salina) por 30 min; submetidas ao bloqueio dos radicais aldeídicos livres, pela lavagem com 0,1M de glicina em PBS; e dos sítios inespecíficos, pela incubação com o BSA 1% em PBS por 1 hora; sendo a seguir incubadas com seus respectivos anticorpos primários e secundários, descritos na Tabela 2.

Todas as etapas de lavagens foram realizadas por centrifugação, utilizando centrífuga refrigerada por 10 minutos a 1800rpm.

A seguir procedeu-se à análise de 50.000 eventos no Citômetro de Fluxo (FACScalibur – Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA – EUA). Os eventos foram adquiridos e analisados com o auxílio do Programa Flowing Software 2.5.1.

Primário	Catálogo	Diluição	Secundário	Catálogo	Diluição
$\alpha_5\beta_1$	Chemicon AB 1950	1:200	Anti-IgG de Cabra conjugado com Alexa Flúor 488 (Thermo Fisher Scientific)	A11078	1:300
β_1	Millipore NG 1800861	1:70	Anti-IgG de Coelho conjugado com FITC Jackson (Thermo Fisher Scientific)	111-095-003	1:300
Talina	SC 7534	1:100	Anti-IgG de Cabra conjugado com Alexa Flúor 488 (Thermo Fisher Scientific)	A11078	1:300
CD44	BD 550538	1:100	Anti-IgG de Rato conjugado com FITC (Jackson ImmunoResearch)	A112-095-003	1:300

Tabela 2. Anticorpos primários e secundários utilizados. A Tabela acima resume os anticorpos utilizados, bem como suas diluições empregadas.

4.2.4. Expressão gênica

Células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 6 poços (TPP), 10^5 células por poço, e mantidas em cultura por 24h, e então submetidas ao tratamento ou não (controle) com o polissacarídeo P1, por 72h, na concentração $100\mu\text{g/mL}$.

Após este período, o RNA foi extraído utilizando o kit de extração por coluna de separação E.Z.N.A.TM Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek – R6834-02), seguindo o protocolo proposto pelo fabricante.

A amplificação dos transcritos de interesse foi realizada pela reação de qRT-PCR, utilizando o kit master mix Power SYBR® Green RNA-to-CTTM 1-Step Kit (Applied Biosystems®), no equipamento StepOnePlus da Applied Biosystems®.

O PCR em tempo real foi utilizado para avaliar a expressão gênica relativa das metaloproteases MMP-2, MMP-9, dos proteoglicanos Sindecam (1 e 2), Glipicam 3, Perlecam, bem como das enzimas modeladores dos GAGs, como heparanase, hialuronidase 1 e hialuronidase 2 e da enzima de síntese do ácido hialurônico: HAS-2.

Os valores de CT dos genes alvo foram representados como unidades relativas de expressão, normalizados (software geNorm 3.4) por controles endógenos como HPRT, β -Actina e GAPDH. O método de análise utilizado foi Delta-Delta C_T ($\Delta\Delta C_T$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os primers utilizados seguem abaixo na Tabela 3.

Gene	Concentração	Sentido	Sequência
Sindecam-1	800nM	F: R:	5'-GGCAACTCGGATCCACGAA-3' 5'-GGAGGAACATTTACAGCCACAA-3'
Sindecam-2	400nM	F: R:	5'-TTCCCCCAAAGTGGAAACCAT-3' 5'-TGTCAACTTCCTCCTTGTCAGT-3'
Glipicam-3	400nM	F: R:	5'-TCTACGACATGGAGAATGTGC-3' 5'-CAGATCTATATTGGCGTTGCTGG-3'
Perlecam	400nM	F: R:	5'-CCGTCCTGGTCTCGATTACA-3' 5'-AGGAAGTCTCGATGCGGATG-3'
MMP-2	800nM	F: R:	5'-CATCGCCCATCATCAAGTTCC-3' 5'-AGCCATAGAAAGTGTTCAAGTATT-3'
MMP-9	800nM	F: R:	5'-GAACTCACACGACATCTTCCAGT-3' 5'-GTCCACCTTGTTACCTCATTT-3'
HAS-2	800nM	F: R:	5'-GGAGGACGAGTCTATGAGCA-3' 5'-TTATTCTCAGGACACATAGAAACCT-3'
Heparanase	400nM	F: R:	5'-TCTCCTTGACTACTGCTCTTCC-3' 5'-ATGCAACTCCACAAAGTCTTCTC-3'
Hialuronidase-1	400nM	F: R:	5'-AAAGTTTGGAGAATGAAGCCCT-3' 5'-GGTTGGATACCACGGAACCT-3'
Hialuronidase-2	400nM	F: R:	5'-GACTCGGAAGACGCTTCAA-3' 5'-TTGACTATGTAGGGAACCAGCA-3'
ACTB	800nM	F: R:	5'-AAGATCAAGATCATTGCTCCTG-3' 5'-CGTACTCCTGCTTGCTGATC-3'
GAPDH	800nM	F: R:	5'-ATCTTCTTGTGCAGTGCCAG-3' 5'-GGCAACAATCTCCACTTTGCC-3'
HPRT	800nM	F: R:	5'-TCCCTGGTTAAGCAGTACAGCCCC-3' 5'-AGTCTGGCCTGTATCCAACACTTCG-3'

Tabela 3. Primers utilizados no presente estudo.

4.2.5. Marcação metabólica dos glicosaminoglicanos sulfatados

Para avaliar a quantificação de HS, as células foram cultivadas em placas com 24 poços até atingirem a confluência. A seguir, foram lavadas três vezes com meio DMEM na ausência de SFB. Posteriormente, as células foram expostas ao polissacarídeo P1 (100 μ g/mL) ou não (Controle), na presença de 150 μ Ci/ml de [³⁵S]-sulfato de sódio por 18 horas em cultura.

Ao final da incubação o meio de cultura (sobrenadante) foi coletado e as células foram lavadas com PBS (2 vezes) para remoção de componentes do meio condicionado. A seguir, a fração celular (células e matriz extracelular) foi obtida pela

remoção mecânica (rodinho) na presença de ureia 7M em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0, sendo repetido o mesmo procedimento com o tampão na ausência de uréia. Alíquotas do meio e da fração celular foram submetidas à proteólise (incubação com protease alcalina (maxatase 3 mg/ml) em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 a 60° C overnight).

Alíquotas do meio de cultura e das células foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,55%), em tampão PDA (1,3-diaminopropano acetato) 0,05M, pH 9,0 (DIETRICH; DIETRICH, 1976). Os GAGs foram precipitados com o detergente catiônico cetavlon a 0,1% por 2 horas. Os géis foram secos sob ventilação e calor, sendo posteriormente corados com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%.

Após a eletroforese, as amostras foram analisadas e quantificadas pela exposição do gel a um filme radiosensível que excita íons de fósforo.

A seguir, o filme sensibilizado foi submetido à varredura a laser no aparelho Cyclone, um “fosfoimage”, que faz a leitura do fósforo excitado e quantifica como unidade de luminescência, que varia de acordo com o grau de excitação, gerando imagens das bandas através da radioatividade de baixa energia, advinda dos GAGs que incorporaram o sulfato radioativo.

Com base nas imagens obtidas, as bandas dos géis foram recortadas e transferidas para tubos contendo o líquido de cintilação UltimaGold, os quais foram quantificados no contador de Cintilação. Os valores foram normalizados pela quantidade de proteínas de cada amostra.

As proteínas celulares foram quantificadas utilizando um kit para dosagem de proteínas da Pierce (Thermo), conforme recomendação do fabricante.

Estas análises foram desenvolvidas na UNIFESP, no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Prof^a. Dr^a. Helena Bonciani Nader, em colaboração com o aluno Gustavo Rossi, em virtude de não se ter infraestrutura e licença para se trabalhar com traçadores radioativos aqui na UFPR.

4.2.6. Dosagem de ácido hialurônico

Para a quantificação do ácido hialurônico, as células B16-F10, 10.000 por poço, foram plaqueadas em placas de 24 poços (TPP) e mantidas em cultura.

Posteriormente, as células foram expostas ao polissacarídeo P1 por 72h, na concentração 100µg/mL. Ao término da exposição, foram coletadas amostras do extrato celular, conforme descrito a seguir:

As células foram lavadas duas vezes com PBS e mais uma vez, com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8, contendo 0,15 M de NaCl. A seguir, o extrato celular foi obtido pela raspagem das células no mesmo tampão, contendo 7M de ureia e nova raspagem como o tampão na ausência da ureia. Como ambos foram agrupados, a amostra final permaneceu com 3,5 M de ureia.

A diálise do extrato celular foi realizada contra o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8, contendo 0,15 M de NaCl, utilizando membrana de diálise com *cutoff* de 12-14 kDa.

Após a diálise, o volume foi aferido e foi adicionado o mesmo volume de solução, contendo a protease Maxatase (6,0 mg/ml em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8, contendo 0,15 M de NaCl) e foi mantido *overnight* a 56° C. No dia seguinte, as amostras foram fervidas por 20 minutos e congeladas (após esfriar).

Para a dosagem do ácido hialurônico, foi utilizada metodologia descrita por Martins e colaboradores (2003). Brevemente, alíquotas do meio ou do extrato celular (1 µL diluído em 3000 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,75 contendo 1% de BSA) foram aplicadas em placa de multipoços previamente recoberta com proteína de ligação ao ácido hialurônico e a incubação foi mantida *overnight* a 4°C.

A seguir, as placas foram lavadas 10 vezes com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,75 contendo 1% de BSA. Posteriormente, as amostras foram incubadas com 100 µL/poço de proteína de ligação biotinizada (1,6 µg/mL em Tris-HCl 50 mM, pH 7,75 contendo 1% de BSA) por 2 horas, a temperatura ambiente, sob agitação branda.

Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas (10 vezes) e, então, incubadas com 100µL/poço de estreptavidina conjugada com Európio (1 µg/mL em Tris-HCl 50 mM, pH 7,75, contendo 1% de BSA) por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação branda.

Posteriormente, foi realizada nova etapa de lavagem, e as amostras foram incubadas com 200µL de Solução Enhacement (DELFLIA), por 5 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação branda.

A leitura da placa foi realizada no leitor de microplacas Victor 2 (PerkinElmer-Wallac®). Uma curva de concentração conhecida de ácido hialurônico

foi realizada, juntamente com cada leitura. Assim, os resultados obtidos foram expressos em concentração de ácido hialurônico.

Foram realizados três experimentos distintos em triplicata, do extrato celular, em triplicata experimental.

3.2.2.5 **Imunocitoquímica**

Para se avaliar a marcação de CD44 (além da realizada por citometria de fluxo), empregou-se microscopia confocal. As células, 10.000 por poço, foram plaqueadas sobre lamínulas circulares (13mm de diâmetro), em placas de 24 poços (TPP) e mantidas em cultura por 24h. Posteriormente, estas foram expostas ao polissacarídeo P1 por 72h, na concentração 100µg/mL.

Após o tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% em PBS por 30 min (a temperatura ambiente); submetidas ao bloqueio dos radicais aldeídicos livres, pela lavagem com 0,1M de glicina em PBS; e dos sítios inespecíficos, pela incubação com o BSA 1% em PBS por 1 hora; sendo a seguir incubadas com os anticorpos primários anti-CD44, e posteriormente com o anticorpo secundário conjugado com FITC, como descrito anteriormente.

As lâminas foram montadas com o meio de montagem Fluoromont G contendo DAPI; e então seladas com esmalte e analisadas no Microscópio motorizado de Epifluorescência Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), equipado com um escaneamento automático Vslide (Metasystems, Altlussheim, DE) ou em microscópio de varredura a laser confocal, modelo A1R+SiMP (Nikon, Tóquio, Japão).

4.3. ENSAIOS *IN VIVO*

4.3.1. **Animais**

Para os estudos nas três Instituições, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) *Specific Pathogen Free* (SPF), machos da linhagem C57BL/6 WT (*wild type = selvagem*) de 2-3 meses de idade e mantidos em unidades microisoladoras,

dispostas em racks. A temperatura foi controlada entre 20 - 25 °C, com ciclo de fotoperíodo de 12/12h.

Na UFPR (Universidade Federal do Paraná), foram utilizados camundongos C57BL/6 WT, adquiridos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e mantidos no Biotério Central da Universidade Federal do Paraná.

No ICESP, da USP (Universidade de São Paulo), os animais C57BL/6 WT utilizados foram adquiridos do Biotério central da Faculdade de Medicina da USP, e também foram utilizados os camundongos (*Mus musculus*) machos de 2-3 meses de idade, da linhagem C57BL/6 GAL-3/KO (*knockout* para o gene da galectina-3) (HSU et al., 2000; MACHADO et al., 2014).

Os animais utilizados no Moffitt foram animais, adquiridos do Biotério Central da USF (Universidade do Sul da Flórida), conforme regimento *do Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) e recomendações do NIH (*National Institute of Health*). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), machos e fêmeas (conforme atual recomendação do NIH, 2015 – CLAYTON e COLLINS, 2014) de 2-3 meses de idade, da linhagem C57BL/6 WT = Selvagem.

Este projeto tem a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, segundo determinação da Lei Nacional nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, sob protocolo 746 do CEUA (Anexo 1).

Para todos os experimentos *in vivo*, as células B16-F10 foram mantidas em cultura sem antibiótico, e após atingirem a confluência de 80% foram removidas da placa com tripsina. Então foram lavadas duas vezes com PBS, verificada a viabilidade com Azul de Tripán, sendo utilizadas quando estavam com viabilidade acima de 90%.

A seguir, 5×10^5 células B16-F10 viáveis, em 100µL de PBS foram injetadas subcutaneamente no flanco dorsal direito de cada animal – dia zero.

No dia 5, o tratamento foi iniciado com injeções intraperitoniais diárias, até o dia 14 (totalizando 10 dias de tratamento), e os grupos avaliados foram:

- Controle (somente PBS);
- P1 (50mg/kg de animal);

- DTI (Dacarbazina) (80 mg/kg de animal) – quimioterápico padrão para tratamento do melanoma;
- P1 (50mg/kg de animal) + DTI (Dacarbazina 80 mg/kg de animal);
- SAC (Sacarose) (50mg/kg de animal) para controle da osmolaridade.
- P1 (50mg/kg de animal) + SAC (Sacarose) (50mg/kg de animal) para controle da osmolaridade.

Durante os 15 dias de experimento os animais foram monitorados diariamente, quanto ao volume do tumor. Ao final de 15 dias os animais foram anestesiados, coletado o sangue pela veia cava, coletado os órgãos e o tumor, e então eutanasiados por deslocamento cervical, 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.

Ao final do experimento, as carcaças foram encaminhadas para descarte de lixo biológico de cada Instituição.

4.3.2. Dacarbazina

A Dacarbazina (DTI) (Sigma D2390) é um quimioterápico antineoplásico, funciona como um agente de alquilação, tendo ação antitumoral não específica do ciclo celular, mais comumente utilizado para o tratamento contra o melanoma (Ministério da Saúde - Secretaria de Atenção à Saúde, PORTARIA Nº 357, DE 8 DE ABRIL DE 2013). Sendo utilizada em doses diárias intraperitoniais de 80 mg/kg corpóreo, para o melanoma metastático (ZHANG et al., 2013b)

Para os ensaios *in vivo* neste trabalho foi utilizada como controle da progressão tumoral, em injeções intraperitoniais diárias de 80mg/kg de animal, diluídos em PBS com 1% de HCl.

4.3.3. Avaliação do volume tumoral

Diariamente os animais eram analisados no flanco dorsal, quanto ao volume do tumoral, através da medição dos diâmetros do tumor, com paquímetro digital (FORD).

O cálculo do volume foi realizado através da fórmula:

$$\text{Volume tumoral (cm}^3\text{)} = (d).(d).(D).(0,52)$$

Sendo:

d=diâmetro menor

D=diâmetro maior

0,52 = fator do cálculo do volume da elipse

4.3.4. Avaliação do peso dos órgãos, hemograma completo e perfil bioquímico

Ao final do experimento os animais foram anestesiados, pesados, o sangue foi coletado da veia cava dos animais, com seringas heparinizada, e os órgãos foram coletados, conforme descrito por Martins e colaboradores (2015).

A relação peso/peso corporal foi considerada em gramas (g) e transformada em peso relativo (%).

Imediatamente após a eutanásia, os órgãos (glândula adrenal, baço, rim e pulmões) foram coletados e pesados.

Foi realizado o hemograma completo, avaliando leucócitos totais, glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, segmentadas, bastonetes, eosinófilos e linfócitos.

Além disso, o plasma foi obtido após centrifugação do sangue a 3000g durante 10 minutos, e então estas amostras foram utilizadas para determinar o perfil bioquímico, avaliando ALT, AST, fosfatase alcalina, colesterol, triglicéridos, 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.

4.3.5. Avaliação da evolução tumoral

Os animais portadores de melanoma receberam uma injeção intraperitoneal de 100 μ L da solução de Luciferina 15mg/mL (SIGMA), diluída em PBS, nos dias 05, 08, 12 e 15 de tratamento. Após 5 minutos (tempo necessário para a metabolização), os animais foram anestesiados com Isoflurano nível 3 + O₂.

Após a anestesia, o pelo do local do tumor foi removido com uma máquina de cortar pelo. Então os animais foram colocados no equipamento IVIS 200 Xenogen VIVIO VISION (PerkinElmer), para captação da bioluminescência da Luciferina. Lembrando que as células inoculadas para o crescimento tumoral foram as B16-F10-luciferase, que são capazes então de metabolizar a luciferina, e assim emitir fluorescência.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* 5.0 (GraphPad Software®, Inc.). Testes paramétricos tais ANOVA *one-way*; *two-tailed* ANOVA, teste-T não pareado, ou *Wilcoxon matched pairs test, two tailed* foram utilizados, conforme legenda nas figuras dos resultados. Os dados são relatados como média \pm DP com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5. RESULTADOS

Dados anteriores do grupo (BISCAIA, 2012) demonstraram que o polissacarídeo P1 não é citotóxico para melanoma em cultura (células B16-F10), mas induz o aumento do espraiamento sobre laminina, vitronectina e fibronectina, e mais interessante, reduz a invasão celular em 42%. De posse destes resultados, o próximo passo do estudo, desenvolvido no presente trabalho, foi investigar se o P1 altera a migração celular.

5.1. P1 REDUZ A MIGRAÇÃO CELULAR

A transformação de melanócitos em melanoma envolve uma série de fatores genéticos e ambientais, como a perda da adesão e mutação dos genes que regulam o crescimento celular (HAASS; SMALLEY; HERLYN, 2004). Para uma metástase eficiente, as células de melanoma invasivas precisam reorganizar o citoesqueleto, e alterar os contatos com a MEC e com as células estromais (ORGAZ; SANZ-MORENO, 2013). Portanto, o evento da migração é muito importante para o início do processo de metástase.

Por essa razão, foi avaliado se o polissacarídeo P1 é capaz de alterar a migração celular, utilizando o método de “Scratch”.

Na figura 25, nota-se que ao final de 12h, o grupo tratado com o P1 obteve um percentual de área aberta de 22,15% e o grupo controle obteve um percentual de área aberta de 10,57%. Assim o grupo P1 apresenta uma redução na migração, sendo esta uma diferença significativa ($p= 0,0249$), demonstrando assim que o P1 reduz a migração celular.

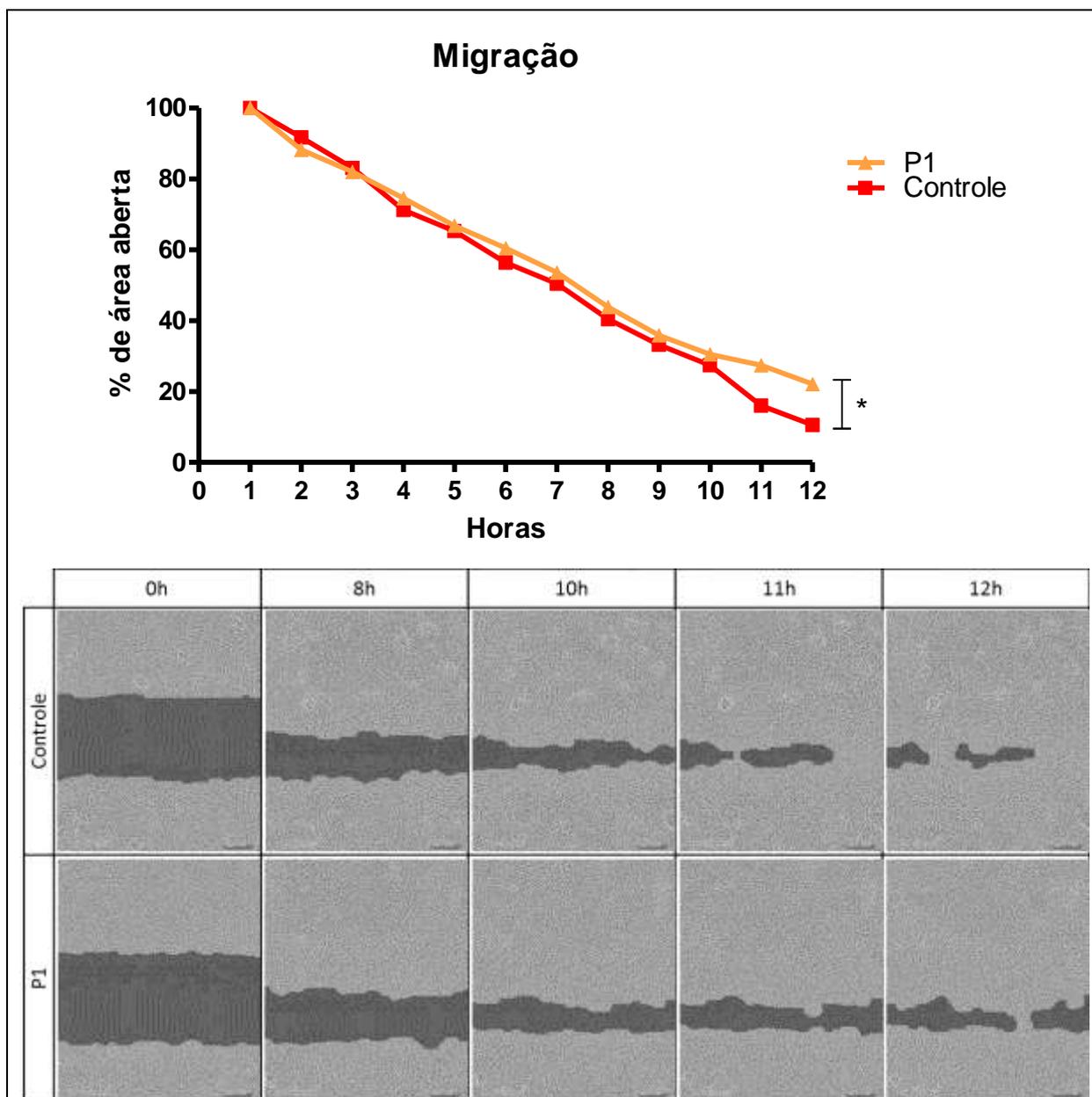


FIGURA 25: Análise da migração celular após exposição ao P1. As células B16-F10 foram expostas a 100 µg/mL do polissacarídeo P1, ou não (controle), por um período de tratamento de 72h e então, submetidas ao método do “Scratch” e acompanhadas por 12h, em meio sem soro e com adição de mitomicina conforme material e métodos. Gráfico representativo de 3 ensaios independentes. As áreas escuras das imagens representam a área aberta (sem células). Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste-t pareado, *two tailed*, com significância para $**p=0,0249$.

Visto que a migração celular é regulada pela reorganização da MEC (THEOCHARIS *et al.*, 2016) e, por outro lado, como discutido anteriormente, P1 altera a adesão e o espreiamento celular sobre diferentes proteínas da MEC (BISCAIA, 2012), o próximo passo deste trabalho foi investigar específicas moléculas moduladoras da adesão celular.

5.2. P1 AUMENTA MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR

A perda da adesão celular das células tumorais contribui para alterações de diferentes dinâmicas celulares resultando no aumento da capacidade de migração celular, da proliferação, invasão, bem como disseminação metastática e colonização para órgãos distantes. A adesão é mediada pela interação da MEC com microdomínios externos de receptores da membrana plasmática das células tumorais, bem como interações com as células do microambiente tumoral. Essas interações são mediadas por integrinas (HAMIDI; PIETILÄ; IVASKA, 2016).

Vale lembrar que as integrinas são glicoproteínas transmembranares, estas interagem com moléculas da MEC, e internamente, estas interações são moduladas via proteínas acessórias citoplasmáticas, como a talina e a vinculina (LEGATE et al., 2009; WOODS; COUCHMAN, 2000).

Considerando que previamente já foi mostrado que P1 aumentou o espriamento sobre laminina, fibronectina e vitronectina (BISCAIA, 2012), o passo seguinte foi avaliar se a integrina $\alpha_5\beta_1$, conhecida como receptor para fibronectina, pode ter sido modulada após o tratamento com P1 e também objetivou uma abordagem mais geral, avaliando somente a subunidade β_1 (que está presente em várias outras integrinas).

Essas análises foram realizadas utilizando imunomarcção e avaliação em citometria de fluxo. Os resultados estão ilustrados na figura 26, e fica evidente que o tratamento com P1 leva a um aumento tanto de $\alpha_5\beta_1$ ($p < 0,0001$), quanto de β_1 ($p = 0,0004$). Ainda, foi investigado se o tratamento com P1 poderia também modular proteínas acessórias que constituem os contatos focais, do grupo tratado com P1 em relação ao grupo controle não tratado.

Complementando estes dados, a proteína acessória citoplasmática de ancoragem, talina, também se apresentou aumentada ($p = 0,0001$) (Fig. 26).

Sabe-se que os estudos mostram que as integrinas são influenciadas por fatores de crescimento; mas também os proteoglicanos de heparan sulfato, tais como da família dos sindecans, também exercem funções de correceptores modulando a ação das integrinas e, conseqüentemente, os mecanismos celulares mediados por essas proteínas, como a adesão e a migração celular (LEGATE et al., 2009).

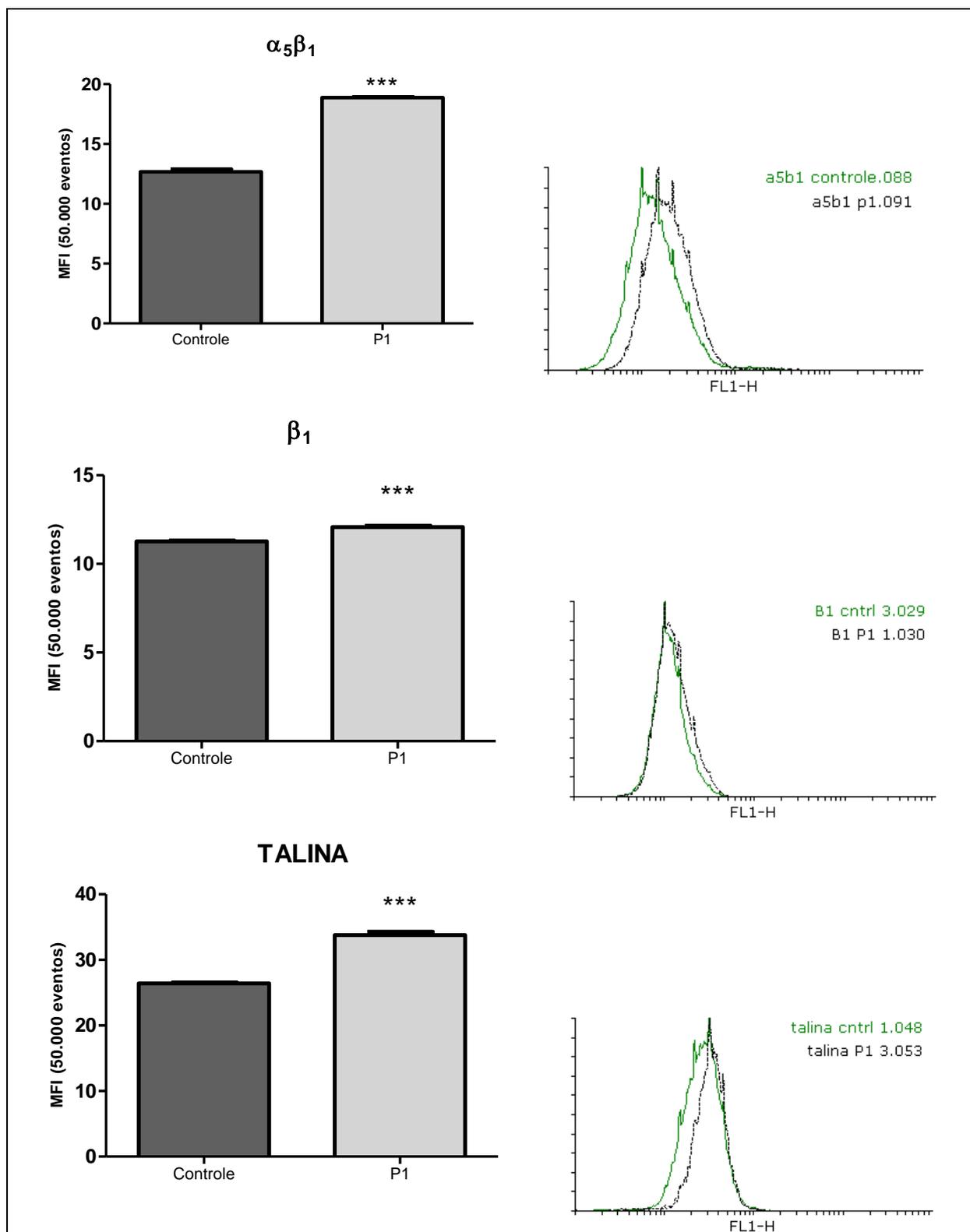


FIGURA 26. Análise por citometria de fluxo de integrina $\alpha_5\beta_1$, da subunidade β_1 de integrinas, bem como da proteína acessória talina. Células B16-F10 foram expostas a 100 $\mu\text{g/mL}$ do polissacarídeo P1 por 72h. A seguir, as moléculas de interesse foram imunomarcadas e então adquiridas 50.000 eventos em citometria de fluxo. Os resultados são relativos a uma triplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste-t não pareado, *two tailed*, com significância para integrina $\alpha_5\beta_1$ (***) $p < 0,0001$), β_1 (***) $p = 0,0004$) e talina (***) $p = 0,0001$).

Assim, o próximo passo foi investigar outras moléculas que estão envolvidas na adesão celular e são importantes para o fenótipo tumoral no modelo de melanoma, como os proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs), pois também são moléculas chaves no processo de invasão, migração e proliferação tumoral.

5.3. O TRATAMENTO COM P1 LEVA A ALTERAÇÕES DE PGHS

Como discutido anteriormente, melanoma superexpressa Proteoglicanos de Heparan Sulfato (PGHS), tanto os de membrana (da família dos Sindecans e dos Glipicans), quanto de MEC (Perlecan) (NIKITOVIC et al., 2014).

Como os PGHS são moléculas importantes no mecanismo de adesão, migração e invasão celular (IOZZO; SCHAEFER, 2015), buscou-se avaliar se P1 poderia levar a alterações desses proteoglicanos.

Quando foi avaliada a expressão gênica dos sindecans-1 e 2 observou-se que o tratamento levou a diminuição significativa da sindecam-1 ($p=0,0265$), mas não alterou a expressão gênica de sindecam-2 ($p=0,6339$) (Figura 27).

Assim passou-se a investigar outro PGHS, o glipicam-3, que também poderia estar envolvido nestas dinâmicas, moduladas pelo P1.

Vale destacar que há indícios na literatura que o Glipicam-3 pode ser empregado com um marcador de melanoma, e tem a função de interagir com os fatores de crescimento, bem como estar envolvido na proliferação e sobrevivência das células (NAKATSURA; KAGESHITA; ITO, 2004).

A análise de expressão gênica de glipicam-3 mostra que o tratamento com P1 não leva a diferença significativa ($p=0,7610$), mas também não induziu aumento de expressão (Figura 27).

Quanto ao perlecan, PGHS da membrana basal intimamente relacionado com os eventos celulares como a adesão celular, inflamação e angiogênese no câncer, entre outros (GUBBIOTTI; NEILL; IOZZO, 2016), a análise da expressão gênica mostrou que o tratamento com o polissacarídeo P1 leva a uma diminuição significativa ($p=0,0001$) deste composto (Figura 27).

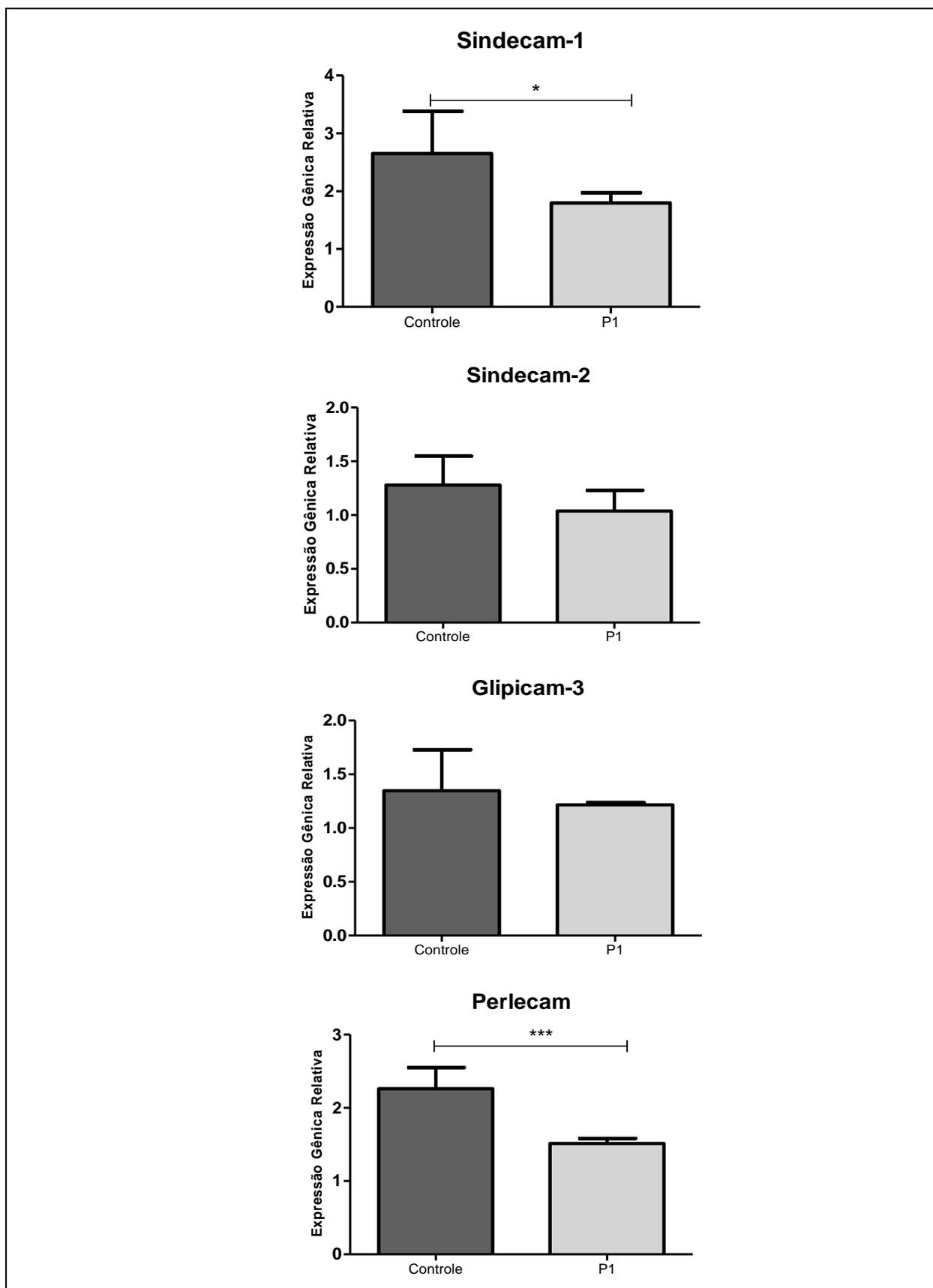


FIGURA 27. Avaliação de proteoglicanos de heparan sulfato por qRT-PCR. As células B16-F10 foram expostas a 100 µg/mL de P1, por 72h. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por teste-t pareado, com significância de Sindecam-1 (triplicata técnica) * $p=0,0265$; Mann-Whitney test, com significância de Perlecam (duplicata técnica) *** $p=0,0001$.

Após constatar que o tratamento com P1 altera a expressão de alguns proteoglicanos de heparam sulfato e, sabendo-se que essas moléculas, uma vez em seu destino final (face externa da membrana plasmática ou MEC) podem sofrer ação enzimática, o próximo passo foi avaliar as enzimas que fazem “shedding” (MMPs).

5.4. P1 REDUZ EXPRESSÃO GENICA DE MMP-9

Como discutido anteriormente, MMPs são endopeptidases que clivam a MEC, e assim remodelam os tecidos, mas também tem funções importantes para liberar fatores de crescimento e citocinas. Estas funções são utilizadas pelas células tumorais e são fundamentais nos processos de progressão e invasão celular, que resultam num fenótipo invasivo, gerando assim metástases (RUCCI; SANITÀ; ANGELUCCI, 2011).

Neste trabalho, avaliou-se a expressão gênica das metaloproteases 2 e 9, após as células B16-F10 serem expostas ou não ao polissacarídeo P1. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 28, onde se pode verificar que não houve alteração da expressão gênica de MMP-2, mas houve uma diminuição significativa da expressão da MMP-9 ($p=0,0095$).

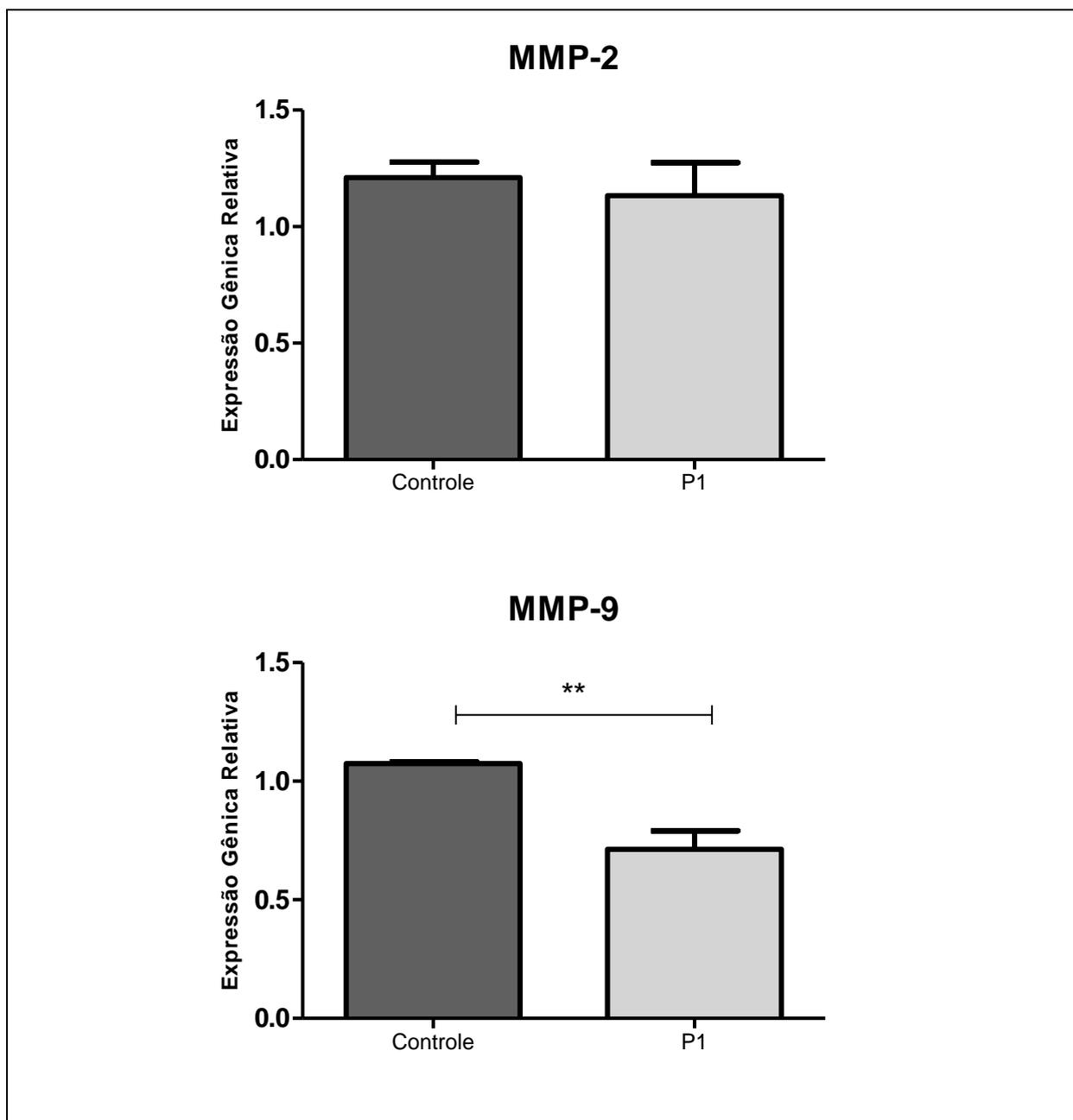


FIGURA 28. Análise da expressão gênica de metaloproteases. A figura acima ilustra a avaliação da expressão gênica realizada por qRT-PCR de B16-F10 que foram expostas ou não (controle) a 100 μ g/mL do polissacarídeo P1 por 72h. Os resultados são relativos a uma triplicata experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por teste t não pareado, com significância de $**p=0,0095$.

Apesar do tratamento com P1 não induzir alteração em MMP-2, a MMP-9 foi significativamente reduzida, o que poderia resultar na redução da liberação (shedding) de PGHS. Assim, o próximo passo foi avaliar a cadeia sacarídica de heparam sulfato, bem como a sua enzima de degradação, a heparanase.

5.5. P1 REDUZ HEPARANASE E RESULTA EM AUMENTO DE HS

A heparanase é uma enzima que degrada as cadeias de glicosaminoglicanos de heparam sulfato (HS) (JUNG et al., 2016). Vale destacar que esta enzima está associada com o comportamento agressivo do melanoma, porque libera fragmentos de heparam sulfato e estes possuem característica angiogênica e também influenciam a proliferação, migração, diferenciação e invasão celular (IOZZO; SANDERSON, 2011; ROY; MARCHETTI, 2009; SANDERSON et al., 2005).

Quando foi avaliada a expressão gênica de heparanase observou-se que P1 levou a sua redução, de forma significativa ($p < 0,0001$) (Figura 29).

Vale lembrar que, como mostrado anteriormente, o tratamento com P1 levou a redução da expressão gênica de alguns PGHS (Sindecam-1 e de Perlecan, figura 26), mas também das enzimas que os modulam, que fazem a liberação do ectodomínio, “shedases” (como MMP-9) (Figura 28) e da heparanase (Figura 29). Assim, o balanço final da quantidade de heparam sulfato, pode ser diferente do que se observa para a expressão gênica de PGHS.

De fato, quando foi avaliada a produção de HS, por marcação metabólica (com [35S]-Sulfato de Sódio), constatou-se que o tratamento com P1 levou a um aumento significativo ($p = 0,0478$) (Figura 29). Isto demonstrou que o balanço final (resultante da expressão de PGHS e processamento pelas enzimas, “shedases” e heparanase) na quantidade de heparam sulfato, resultante nas células ou na MEC, aumentou.

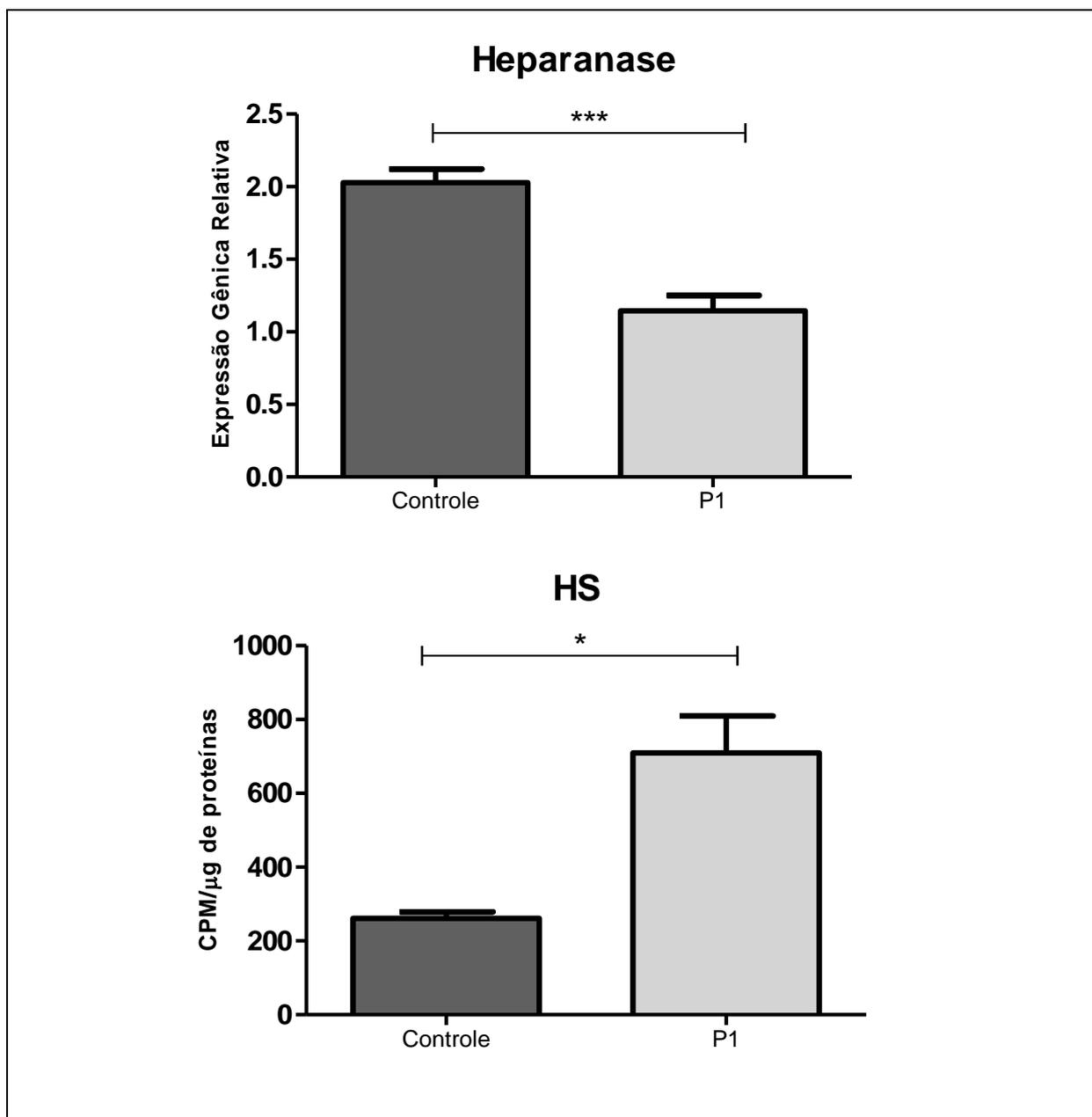


Figura 29. Análise de heparam sulfato e de heparanase. A figura acima ilustra a avaliação da expressão gênica de heparanase (realizada por qRT-PCR) e a quantificação de heparam sulfato no extrato celular, por marcação metabólica utilizando $[^{35}\text{S}]$ -Sulfato de sódio. Para tanto, células B16-F10 foram expostas ou não (controle) a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do polissacarídeo P1 por 72h e então submetidas a marcação metabólica com sulfato radioativo ou foi extraído o RNA para análise da expressão gênica. Os resultados são relativos a uma triplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste t não pareado, com significância para heparanase de $***p < 0,0001$ e para heparam sulfato de $*p = 0,0478$.

No intuito de buscar novos subsídios moleculares que justifiquem a alteração do comportamento celular observado após o tratamento com o P1, o próximo passo foi investigar outro glicosaminoglicano importante, o ácido hialurônico (AH), bem como suas enzimas de degradação, síntese e seu receptor.

5.6. O TRATAMENTO COM P1 LEVA A MENOR PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo encontrado na matriz extracelular. Quando se apresenta em grandes quantidades, a ligação com seu receptor (CD44) estimula a migração e a formação de novos nódulos tumorais (SIRONEN et al., 2011). Por outro lado, a diminuição de AH inibe a metástase, pois afeta o mecanismo de locomoção e adesão celular, e assim melhora o prognóstico de pacientes com melanoma (KUDO et al., 2004). Já as hialuronidases (Hyal-1 e 2) degradam o AH. A Hyal-2 é extracelular e gera fragmentos menores (de 50 a 100 sacarídeos). Esses fragmentos podem ativar novas funções de crescimento tumoral, que o AH integral não apresentava (SIRONEN et al., 2011).

Face ao exposto, neste trabalho, buscou-se quantificar tanto o AH, quanto as enzimas, de síntese (HAS-2) e as de degradação (Hialuronidase-1 e Hialuronidase-2); bem como seu ligante celular, o receptor CD44.

A Figura 30 ilustra a quantificação de AH e mostra claramente que o tratamento com o polissacarídeo P1 leva a diminuição na quantidade desse glicosaminoglicano ($p=0,0027$).

Quando foi avaliada a expressão gênica de HAS-2, constatou-se que esta também se observa em menor quantidade (Figura 30) após o tratamento com P1 ($p=0,0226$), o que está de acordo com a menor quantidade observada de AH.

A seguir, passou-se a verificar a expressão gênica das hialuronidases, e foi constatado que P1 leva a redução significativa, tanto da expressão gênica da hialuronidases-1 ($p=0,0423$), quanto da hialuronidases-2 ($p=0,0248$) (Figura 30), o que também reforça a ideia de que o polissacarídeo P1 age em ácido hialurônico, reduzindo sua síntese e degradação.

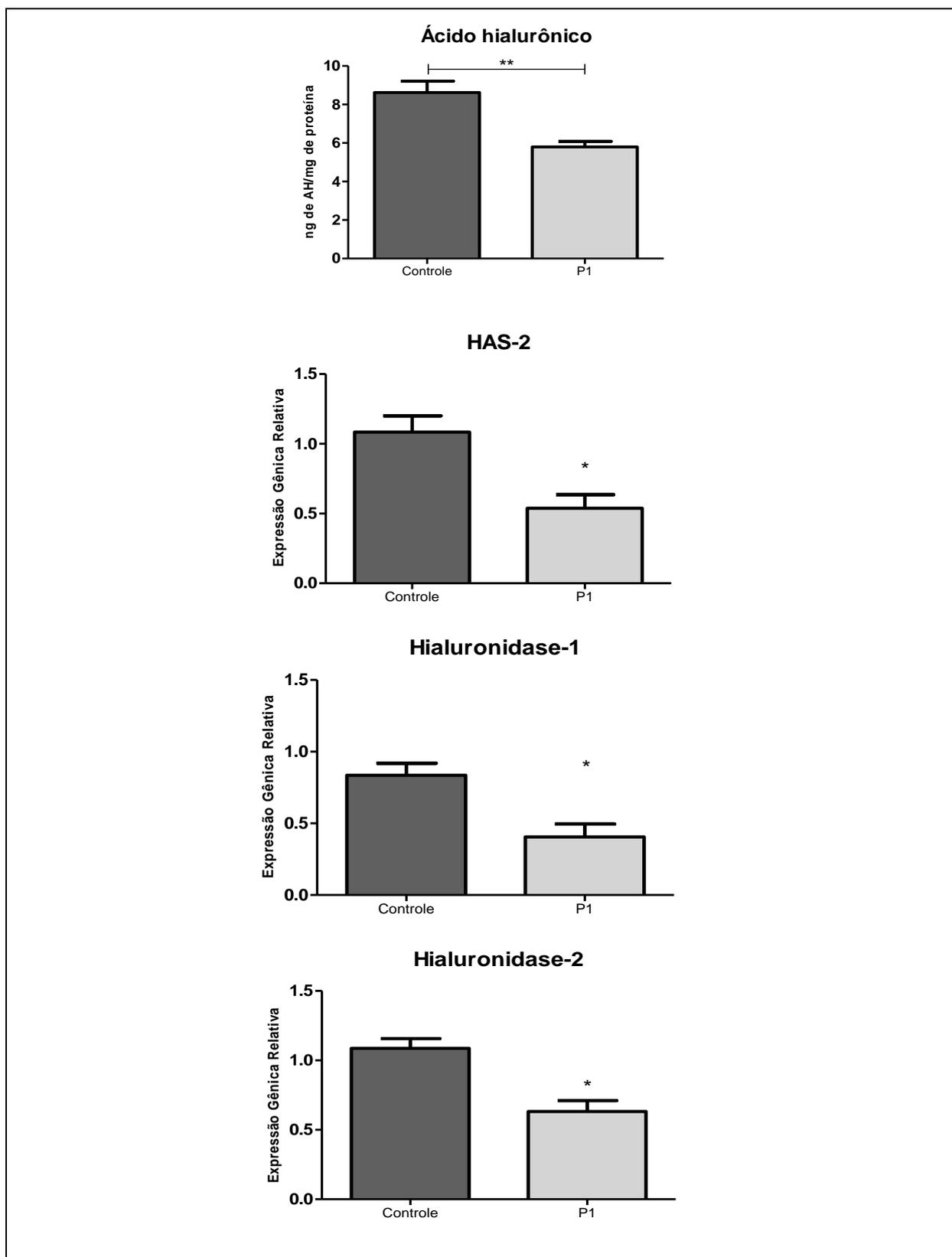


FIGURA 30. Avaliação da quantificação de ácido hialurônico (AH) e da expressão gênica das enzimas do metabolismo do AH. Células B16-F10 foram expostas ou não (controle) a 100µg/mL do polissacarídeo P1 por 72h. Os resultados são relativos a uma triplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste t, com significância de AH **p=0,0027, HAS-2 *p=0,0226, Hialuronidase-1 *p=0,0423, Hailuronidase-2 *p=0,0248.

Para que este mecanismo fosse avaliado de uma forma mais ampla, analisou-se também o receptor CD44, o qual faz uma das ligações do AH com as células.

Observa-se por imunofluorescência que esse receptor apresenta-se diminuído após o tratamento com o polissacarídeo P1, quando comparada ao controle (Figura 31).

Corroborando com este resultado, uma análise quantitativa realizada por citometria de fluxo, também demonstrou que o CD44 está diminuído no grupo tratado ($p=0,0005$). Pois o grupo controle apresentou uma média de intensidade de fluorescência de 47,62 e o grupo tratado com P1 uma média de 35,71; representando uma diminuição de 25% em relação ao grupo controle.

Assim, visualizou-se de várias formas e metodologias o ciclo do ácido hialurônico, o qual se mostrou alterado após tratamento com o P1.

Os resultados obtidos até agora mostram claramente que o tratamento com P1 leva a diminuição da migração celular, aumento de moléculas que alteram a adesão celular, diminuição da expressão gênica de proteoglicanos de heparam sulfato e aumento da porção sacarídica, mas com diminuição das enzimas de degradação (a heparanase e a MMP-9).

Além disso, mostra uma redução no metabolismo de AH, tanto da síntese, degradação e do seu receptor. Até agora esse conjunto de resultados sugere que o tratamento com P1 leva as células de melanoma a reduzirem seu fenótipo metastático, o que foi confirmado anteriormente (BISCAIA, 2012) *in vitro* pela redução da capacidade invasiva das células expostas ao P1, sem provocar citotoxicidade.

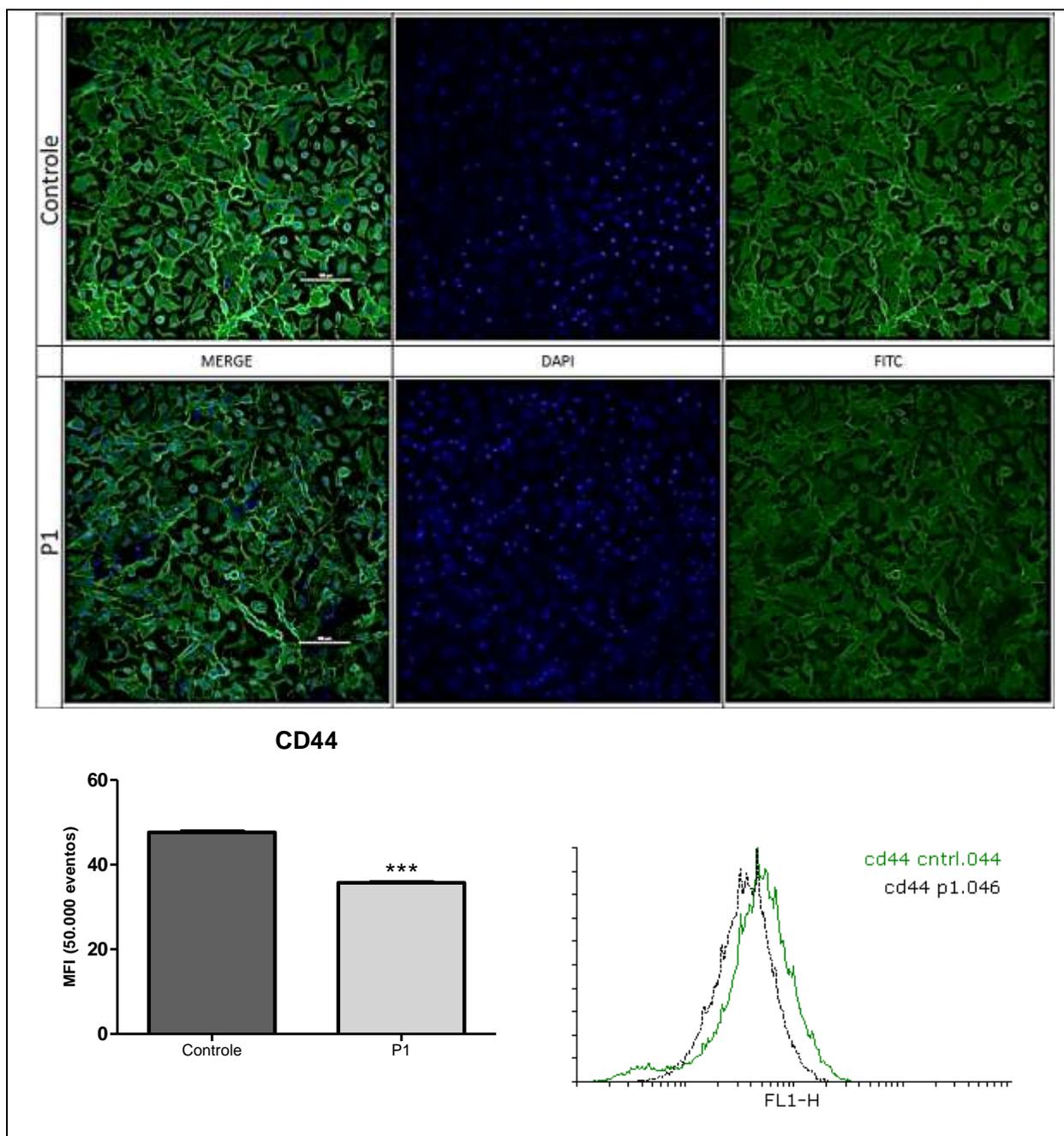


FIGURA 31. Análise do receptor CD44 por microscopia confocal e por citometria de fluxo. A figura acima demonstra a avaliação das células B16-F10 após serem expostas ou não (controle) a 100µg/mL do polissacarídeo P1 por 72h e então foram imunomarcadas para detecção do receptor para AH, CD44, com posterior análise em microscopia confocal (para células plaqueadas em lamínulas) ou citometria de fluxo (células em suspensão). Os resultados são relativos a uma triplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste-T, com significância de CD44 *** $p=0,0005$. Barra: 100 µm.

Em conjunto, esses dados sugerem que o tratamento com P1 é promissor e poderia levar a uma redução do desenvolvimento tumoral, o que nos motivou a investigar em ensaios *in vivo*.

5.7. P1 REDUZ O VOLUME TUMORAL EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE MELANOMA

A literatura relata que cogumelos do tipo *Pleurotus eryngii* apresentam um potencial farmacológico e terapêutico, pois possuem muitas atividades biológicas como: antitumoral, antioxidante, antileucêmica, imunomoduladora entre outras (FU; LIU; ZHANG, 2016).

Neste estudo, os animais foram inoculados com células de melanoma murino, e 5 dias após a inoculação das células foram tratados diariamente com o polissacarídeo P1 (dose de 50mg/Kg de animal), através de injeções intraperitoniais, por um período de 10 dias.

Ao final do experimento, observa-se uma nítida redução ($p=0,0039$) de aproximadamente 60% do volume tumoral, no grupo de animais tratados com P1, em relação ao grupo controle não tratado (Figura 32). Dados similares foram obtidos com ensaios realizados em três Instituições diferentes (UFPR, ICESP-USP e Moffitt/Universidade do Sul da Flórida/EUA).

Esta surpreendente descoberta corrobora com os dados *in vitro*, e nos motivou a seguir com os estudos para entender a ação deste composto.

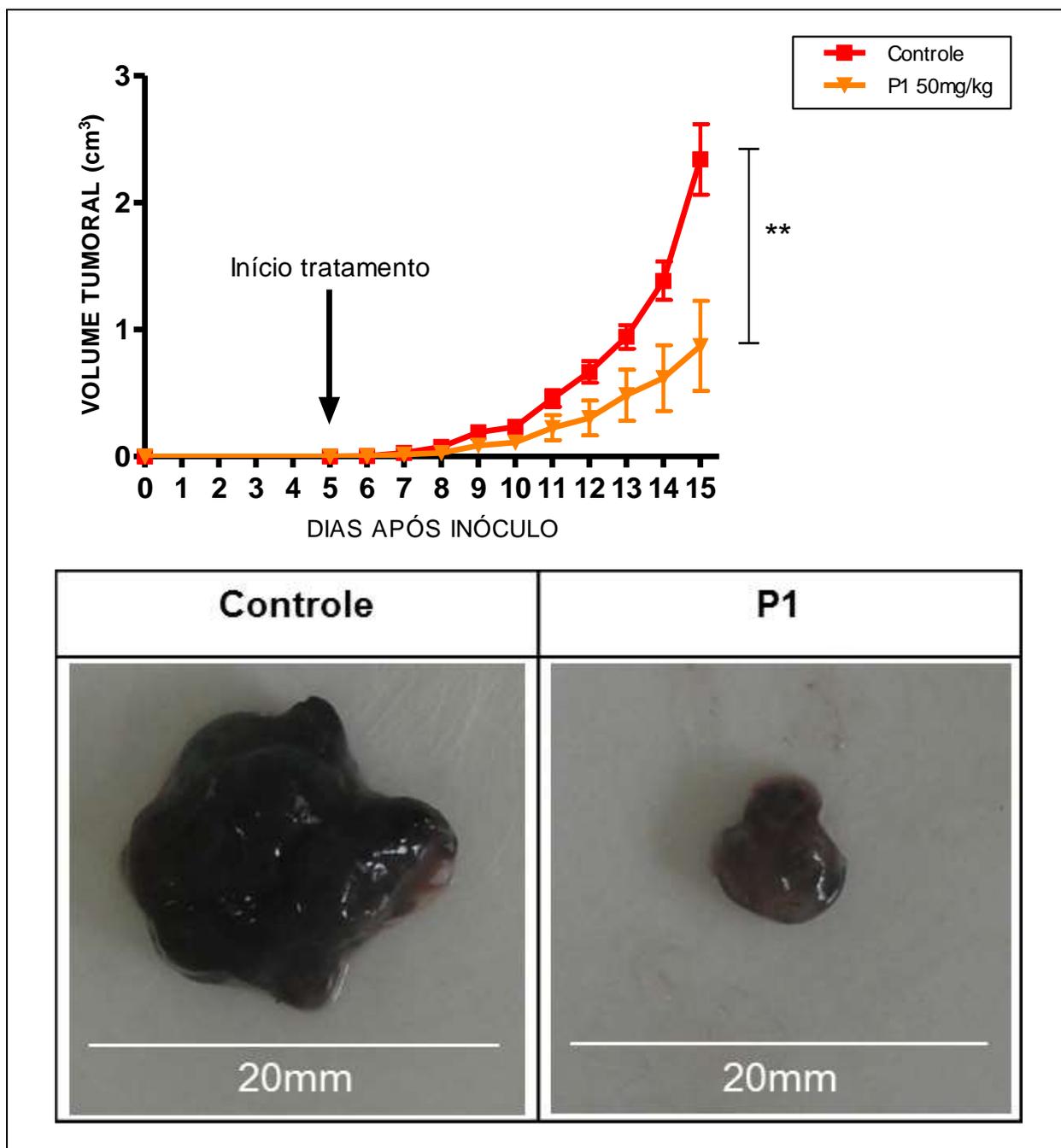


FIGURA 32. Evolução tumoral após tratamento com o P1. A figura acima mostra um experimento ilustrativo da evolução tumoral, representando o conjunto de experimentos realizados nas diferentes instituições, após ensaio com camundongos, inoculados com células B16-F10, e posterior tratamento (do 5º ao 14º dia) com o polissacarídeo P1 em uma concentração de 50mg/kg de peso do animal. Também na figura, demonstram-se as imagens dos tumores coletados no 15º dia, do controle e tratado, visualizando assim a grande diferença entre os grupos. Os dados foram submetidos à análise estatística por Wilcoxon matched pairs test, two tailed (** $p=0,0039$).

5.8. P1 REDUZ O VOLUME TUMORAL INDEPENDENTE DE ALTERAÇÃO DE OSMOLARIDADE

Após esse resultado *in vivo*, de redução tumoral, buscou-se avaliar a influência da osmolaridade para o resultado obtido com o polissacarídeo P1. Para descartar esta hipótese realizaram-se outros experimentos adicionando um grupo tratado com sacarose (SAC).

Como esperado, observa-se na figura 33 que, diferentemente do grupo P1, que mostrou redução tumoral; o grupo sacarose não apresenta diferença do volume tumoral em relação ao controle ($p=0,2031$), mas ao invés disso ele apresenta um efeito de estímulo do crescimento tumoral, de tal forma que no dia 14, os animais apresentaram tumores ulcerados (com presença de canibalismo) (exceto no experimento no Moffitt que não houve a ulceração). Assim, não foram considerados os dados de volume tumoral do grupo sacarose a partir do dia 14.

Esse dado reforça a especificidade da atividade biológica do P1, demonstrando que o efeito é específico desse polissacarídeo, e não é em decorrência da alteração de osmolaridade, onde qualquer açúcar poderia ter induzido esta ação.

Ainda, na figura 33, mostra que quando comparamos os grupos sacarose+P1 e o controle, o efeito de P1 permaneceu ativo ($p=0,0059$), independente da alteração da osmolaridade provocada pela sacarose, reforçando seu efeito antitumoral.

Além disso, se compararmos os grupos de sacarose sozinha com o grupo sacarose+P1, podemos notar a grande diferença no volume tumoral ($p=0,0039$), corroborando com o efeito antitumoral de P1 (Figura 33).

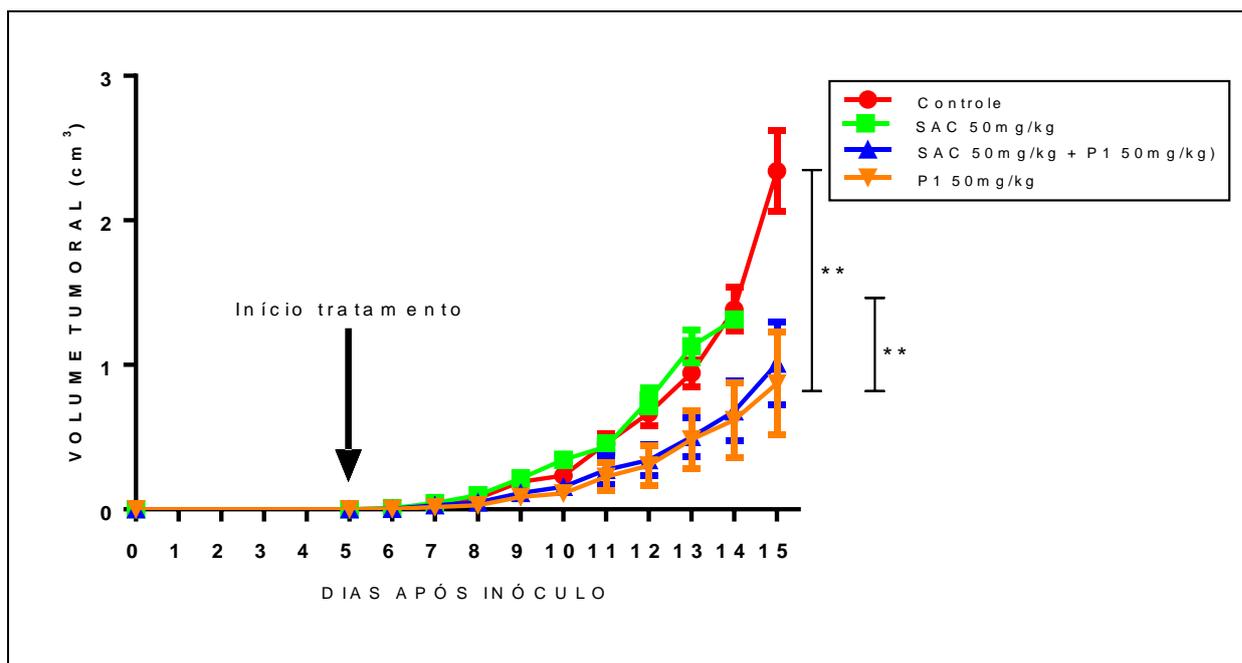


FIGURA 33. Avaliação da evolução tumoral comparando P1 com um controle de osmolaridade.

A figura acima mostra um experimento ilustrativo, representando a avaliação da evolução tumoral, após ensaio com camundongos, inoculados com células B16-F10, e posterior tratamento (do 5º ao 14º dia) ou não (controle) com o polissacarídeo P1 ou com Sacarose (SAC), ambos em concentração de 50mg/kg de peso do animal; e um grupo com os dois tratamentos associados. Observe que a curva do grupo sacarose segue até o dia 14, dia em que os animais sofreram eutanásia.

Após esta confirmação da atividade antitumoral de P1, independente do efeito da osmolaridade, passou-se então a avaliar a comparação do seu efeito, com a ação de um quimioterápico que já é utilizado na clínica no tratamento de melanoma: a dacarbazina (DTI); bem como o efeito de P1 associado ao quimioterápico.

5.9. P1 TEM EFEITO ADJUVANTE ASSOCIADO À DACARBAZINA

Quando se pensa em uma possível utilização na clínica, o primeiro passo é associar um tratamento não citotóxico a um já utilizado de rotina. Assim acrescentou-se o grupo tratado com o quimioterápico dacarbazina (DTI), e outro grupo com a associação de P1 a esse tratamento.

A análise comparativa da ação de P1 e da Dacarbazina (DTI) pode ser observada na figura 34. Inicialmente, quando se compara os grupos controle e DTI, há uma redução no volume tumoral significativa ($p=0,0273$), o que já era esperado, visto que DTI é um quimioterápico. Novamente, P1 (utilizado isoladamente) também mostrou redução do volume tumoral.

Mas quando se compara o grupo P1 e o grupo DTI, não houve alteração significativa entre eles ($p=0,3223$), o que mostra que os dois tem o mesmo potencial antitumorigênico (figura 34).

No entanto, o mais surpreendentemente foi a comparação dos tratamentos isolados (somente P1 ou somente DTI) com o grupo P1+DTI, que mostra uma diferença significativa entre eles ($p=0,0059$), sendo assim um possível efeito adjuvante à DTI (figura 34).

Mostra-se assim que o P1 é um forte candidato a ser um bom adjuvante ao tratamento de DTI, o que pode ser um primeiro passo para uma possível aplicação clínica.

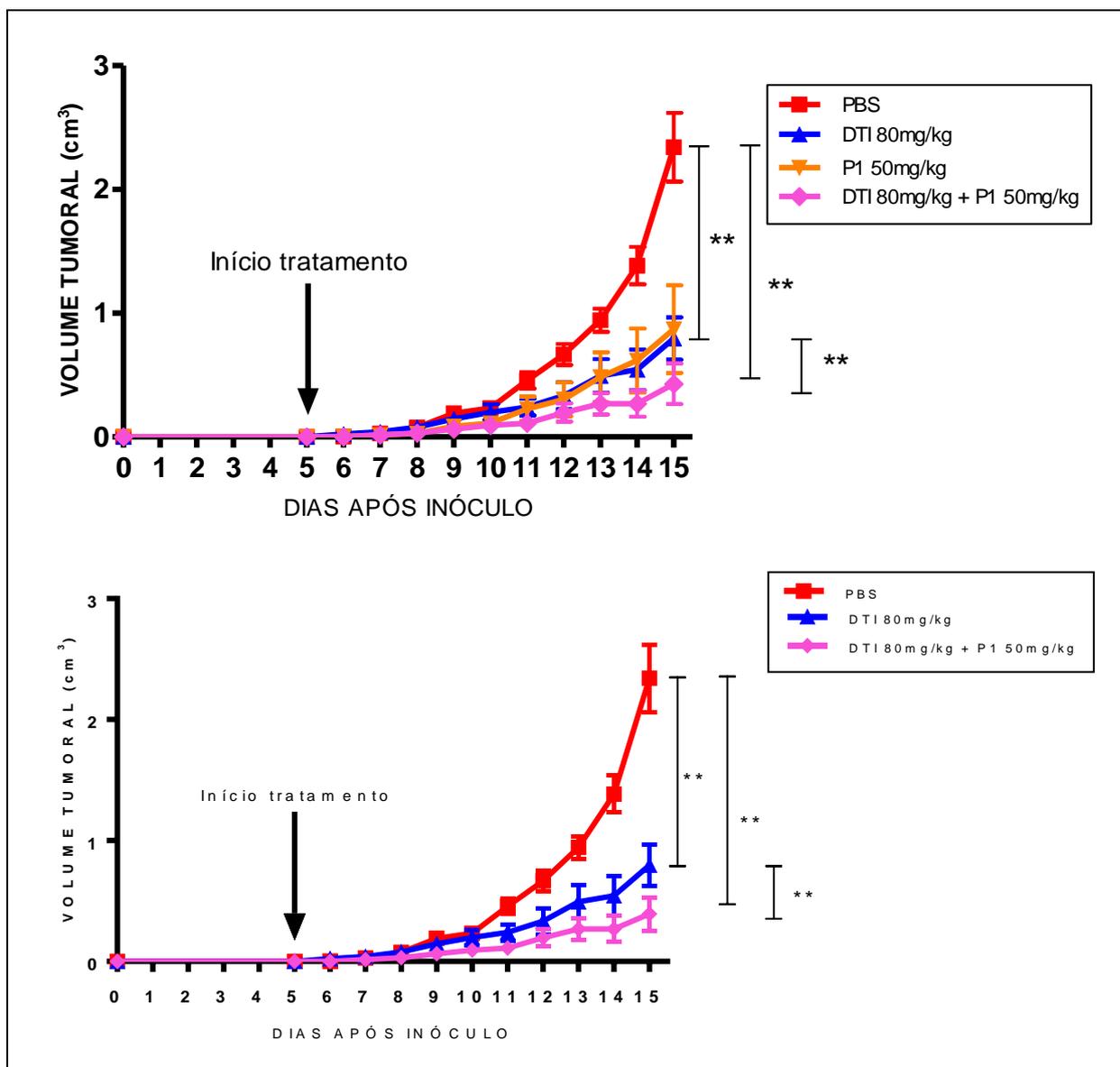


FIGURA 34. Avaliação do efeito antitumoral da DTI em relação ao efeito do P1. A figura acima mostra um experimento ilustrativo (dois gráficos iguais do mesmo experimento, representados separados para melhor visualização), representando o conjunto de experimentos realizados nas diferentes instituições, para avaliar a evolução tumoral, após ensaio com camundongos, inoculados com células B16-F10, e posterior tratamento (do 5º ao 14º dia) com o polissacarídeo P1 (50mg/kg de peso do animal), Dacarbazina (DTI) (80mg/kg de peso do animal); e um grupo DTI (80mg/kg de peso do animal) associado a P1 (50mg/kg de peso do animal). Teste T pareado: DTI com DTI+P1 (** $p=0,0060$); Controle com DTI (* $p=0,0453$); Controle com DTI+P1 (* $p=0,0360$).

Após estes dados, buscou-se avaliar como o P1 age ao longo do desenvolvimento tumoral, através de ensaio com luminescência, o qual se pode acompanhar a evolução do crescimento tumoral, dados estes desenvolvidos no Moffitt.

5.10. P1 LEVA A UMA POSSÍVEL REGRESSÃO TUMORAL

Para avaliar o desenvolvimento tumoral, ao longo do tratamento, foram utilizadas células tumorais B16-F10 que expressam luciferase (B16-F10-luc-G5). Essa enzima é capaz de oxidar a luciferina (injetada intraperitonealmente), gerando bioluminescência. A luz emitida é captada pelo Sistema de Imagem *in vivo* IVIS (PerkinElmer).

Para tanto, foi realizada a coleta dos dados nos dias 5, 8, 12 e 15 do experimento (Figura 35), onde demonstra 3 animais de cada grupo, na sequência dos dias citados anteriormente.

Pode-se observar que os grupos apresentam diferenças com o passar dos dias de tratamento, sendo que a escala de intensidade de luminescência, que varia de azul para menor emissão de luz, isto é, menor atividade de luciferase; para pontos vermelhos, ilustrando maior atividade da enzima e, por consequência, maior acúmulo de células tumorais que expressam luciferase.

No grupo controle, observa-se que ao longo do experimento, o tumor cresce de maneira regular e com maior intensidade de luminescência (pontos vermelhos). Esse resultado também é observado com maior intensidade para o grupo tratado com Sacarose, o que está condizendo com os dados observados nas medições de volume tumoral, mostrados anteriormente.

Já no grupo DTI, o crescimento foi de forma lenta, gerando uma intensidade de luminescência menor, quando comparado ao grupo controle.

Quando se analisa o grupo P1, observa-se que apresenta intensidade de luminescência próxima ao grupo DTI, mas com uma pequena redução entre os dias 12 e 15.

Interessantemente, esse fato se torna mais evidente quando se analisa o grupo P1+DTI, pois se pode observar claramente na imagem, que entre o 12º e 15º há uma grande redução na intensidade de luminescência.

Vale destacar que, como mostrado na figura 32, quando realizada a mensuração do volume tumoral ao longo dos ensaios, não se observa redução do volume tumoral entre esses dias (12º e 15º dia), o que poderia sugerir que as células tumorais estão menos metabolicamente ativas.

Este dado então pode sugerir que o polissacarídeo P1, tem uma possível ação de regressão tumoral, sendo este dado muito promissor.

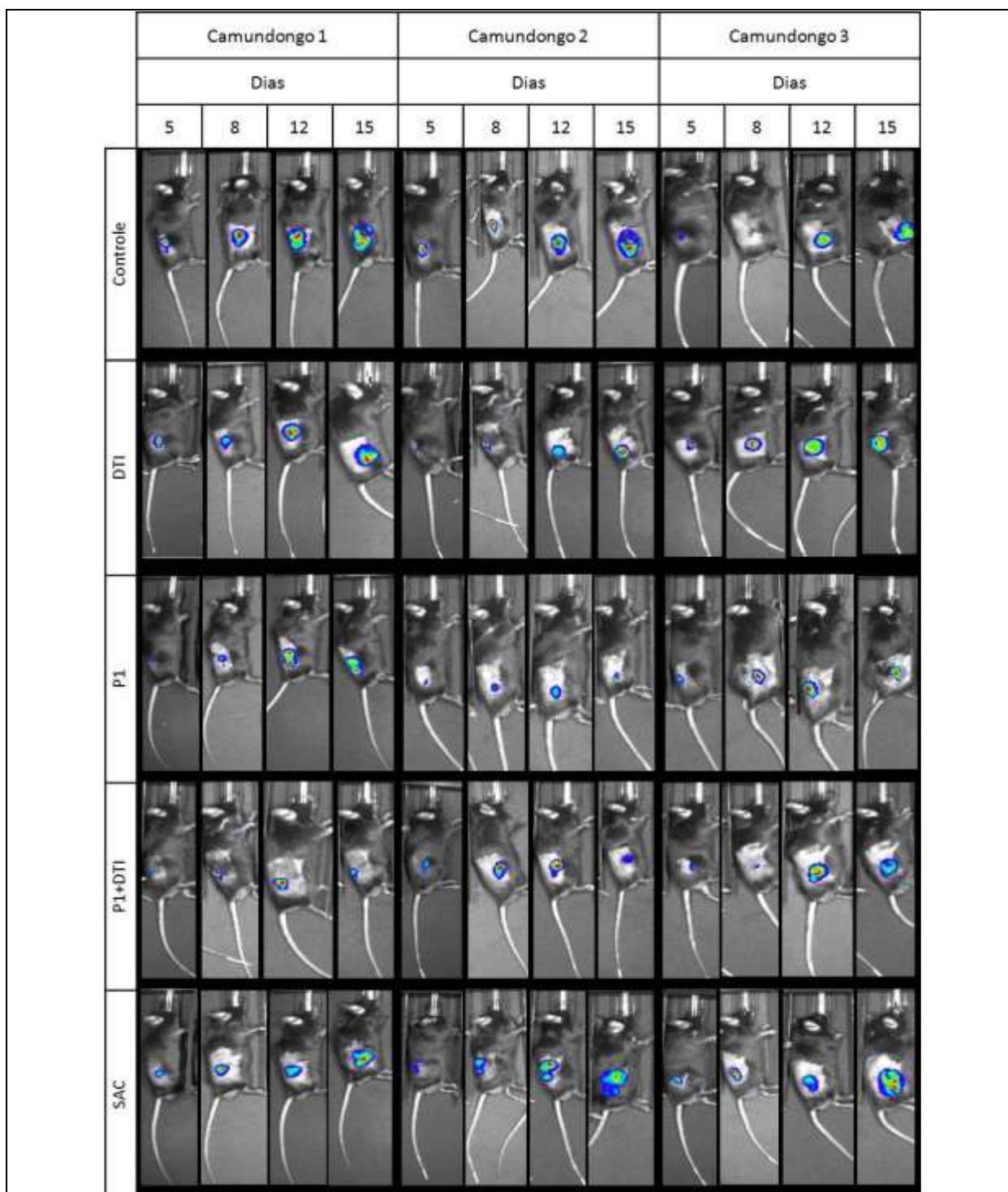


FIGURA 35. Imagens do desenvolvimento do tumor ao longo do tempo. Cada retângulo agrupa o conjunto de imagens obtidas ao longo do tempo (realizados nos dias 5, 8, 12 e 15 do experimento) de um mesmo animal. Observa-se em cada linha, o conjunto de três animais, que foram ou não (Controle), tratado com Sacarose, ou com P1, ou com DTI ou com os dois em associação (P1+DTI). Observa-se que nos animais que receberam P1 ou a associação de P1+DTI, houve uma diminuição da intensidade de luz obtida no último dia da coleta (15º dia), em relação ao anterior (12º dia), o que sugere diminuição da atividade metabólica das células ou regressão tumoral.

Contudo na sequencia, buscou-se avaliar, se este tratamento não poderia possuir algum efeito adverso nos animais, visto que *in vitro* o P1 não se demonstrou citotóxico (BISCAIA, 2012). Para isso, em um primeiro momento, foi avaliado o peso dos órgãos dos animais ao final do tratamento.

5.11. O TRATAMENTO COM P1 NÃO ALTERA PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Para avaliar o peso, tanto corporal, quanto dos órgãos, os animais foram pesados no início e no final do experimento, sendo que após a eutanásia, seus órgãos foram removidos e avaliados (Figura 36). Vale destacar que esta análise foi utilizada para avaliar o estado físico do animal.

Após coletar os órgãos dos animais dos grupos veículo e tratados, estes órgãos foram imediatamente pesados. Desta maneira fez-se a correlação com os pesos dos animais e então se obteve a relação: peso do órgão/peso do animal.

A Figura 36 ilustra a porcentagem relativa obtida para os seguintes órgãos: glândulas adrenais, baço, rins e pulmão de cada animal, onde se pode observar que após análise estatística dos dados, não houve nenhuma diferença entre o grupo tratado e o controle, o que sugere que o tratamento com P1 não causou efeitos adversos, nestes parâmetros analisados.

Apenas faz-se uma observação para a aparente indução de hiperesplenismo, visualizada pelo relativo aumento do peso do baço do grupo P1, o que sugere um possível efeito imunomodulador, mas devem-se realizar mais estudos para confirmar esta observação.

A seguir, buscou-se avaliar os parâmetros fisiológicos do estado dos animais e para tanto, foram analisados os hemogramas dos animais.

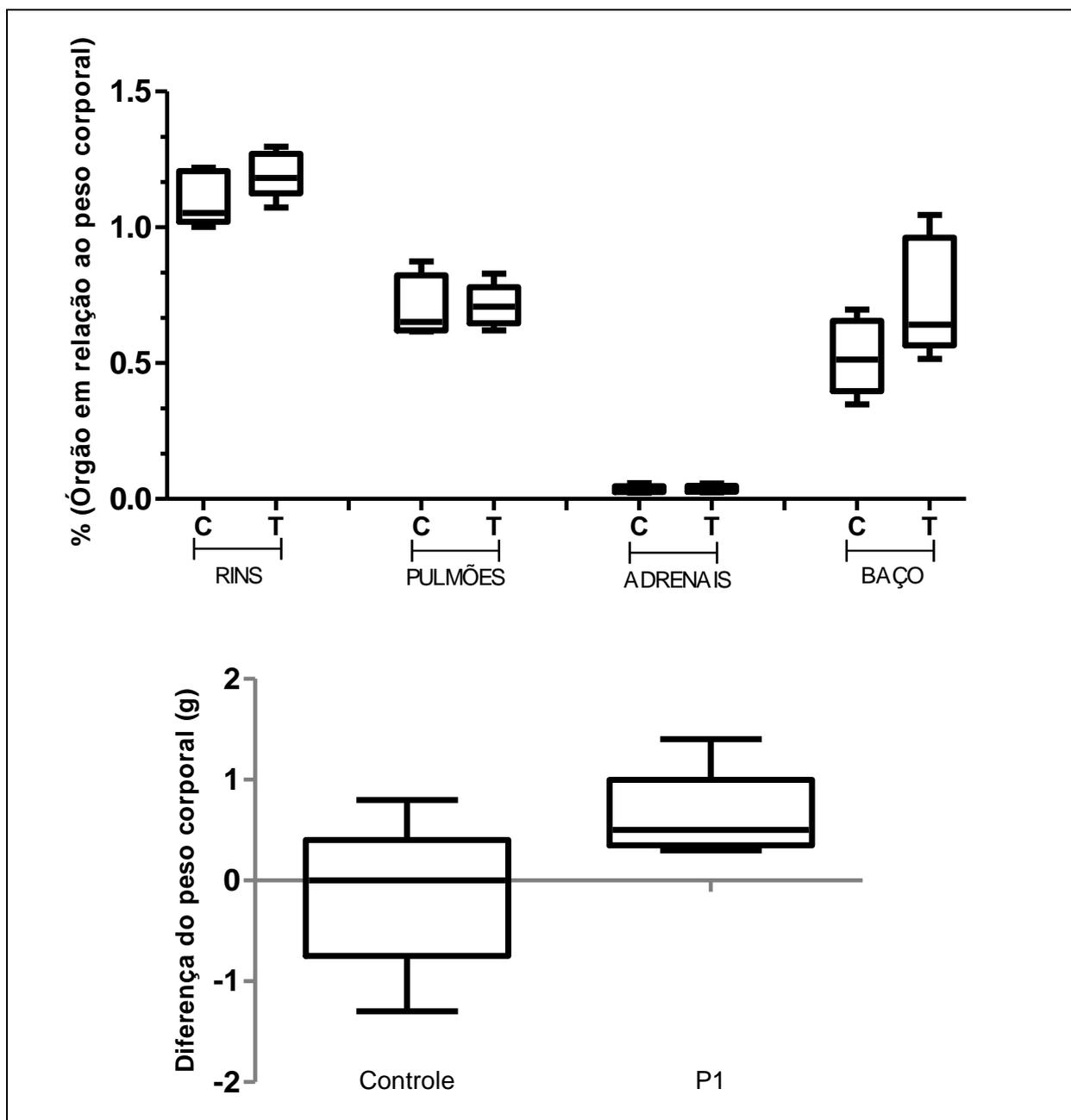


FIGURA 36. Análise dos órgãos após experimento *in vivo*. A figura acima ilustra a análise dos órgãos, após ensaio com camundongos C57BL/6, injetados com células B16-F10, e posterior tratamento (do dia 5 ao dia 14) com o polissacarídeo P1 em uma concentração de 50mg/kg de peso do animal. Os resultados são relativos a uma quintuplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste-t não pareado, sem significância visualizada.

5.12. HEMOGRAMA

Analisaram-se os parâmetros convencionais de hemograma, dos animais dos grupos controle e P1. Os resultados estão ilustrados na Figura 37, onde se pode verificar que não há diferença estatística entre os grupos. Os dados foram também tabulados e estão expressos na Tabela 4 abaixo.

Desta forma, possivelmente o polissacarídeo P1 não provocou nenhum efeito colateral nos animais, visto que não mostrou nenhuma alteração significativa dos parâmetros analisados (Leucócitos totais, Linfócitos, Monócitos, Segmentados, Plaquetas, Bastonetes, Eosinófilos, Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito).

HEMOGRAMA	CONTROLE	P1	Valor de p
Leucócitos totais (WBC) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5.525 \pm 1.095	5.720 \pm 0.6053	0.8736
Linfócitos (%)	63.00 \pm 11.05	63.20 \pm 4.862	0.9862
Monócitos (%)	2.250 \pm 0.2500	2.200 \pm 0.4899	0.9356
Segmentados (%)	32.25 \pm 11.27	31.20 \pm 4.964	0.9291
Plaquetas (PLT) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	312.5 \pm 61.03	355.4 \pm 45.56	0.5825
Bastonetes (%)	1.500 \pm 0.2887	1.400 \pm 0.2449	0.7980
Eosinófilos (%)	1.500 \pm 0.5000	1.600 \pm 0.4000	0.8786
Hemácias (RBC) ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.883 \pm 1.425	7.114 \pm 0.2717	0.8625
Hemoglobina (HGB) (g/dL)	10.65 \pm 1.030	9.660 \pm 0.3906	0.3584
Hematócrito (HCT) (%)	29.70 \pm 6.029	29.08 \pm 1.140	0.9126

TABELA 4. Hemograma dos camundongos tratados ou não com P1. A tabela acima ilustra a análise dos parâmetros do hemograma, após ensaio com camundongos C57BL/6, injetados com células B16-F10, e posterior tratamento (do dia 5 ao dia 14), ou não (controle) com 50mg/kg de peso do animal, do polissacarídeo P1. Os resultados são relativos a uma quintuplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste *t* não pareado, com significância de **p*<0,05, ***p*<0,01 e ****p*<0,001.

Assim o próximo passo foi avaliar os dados bioquímicos, para se verificar outros parâmetros adicionais, com o intuito de confirmar se, de fato, não houve nenhum efeito não esperado.

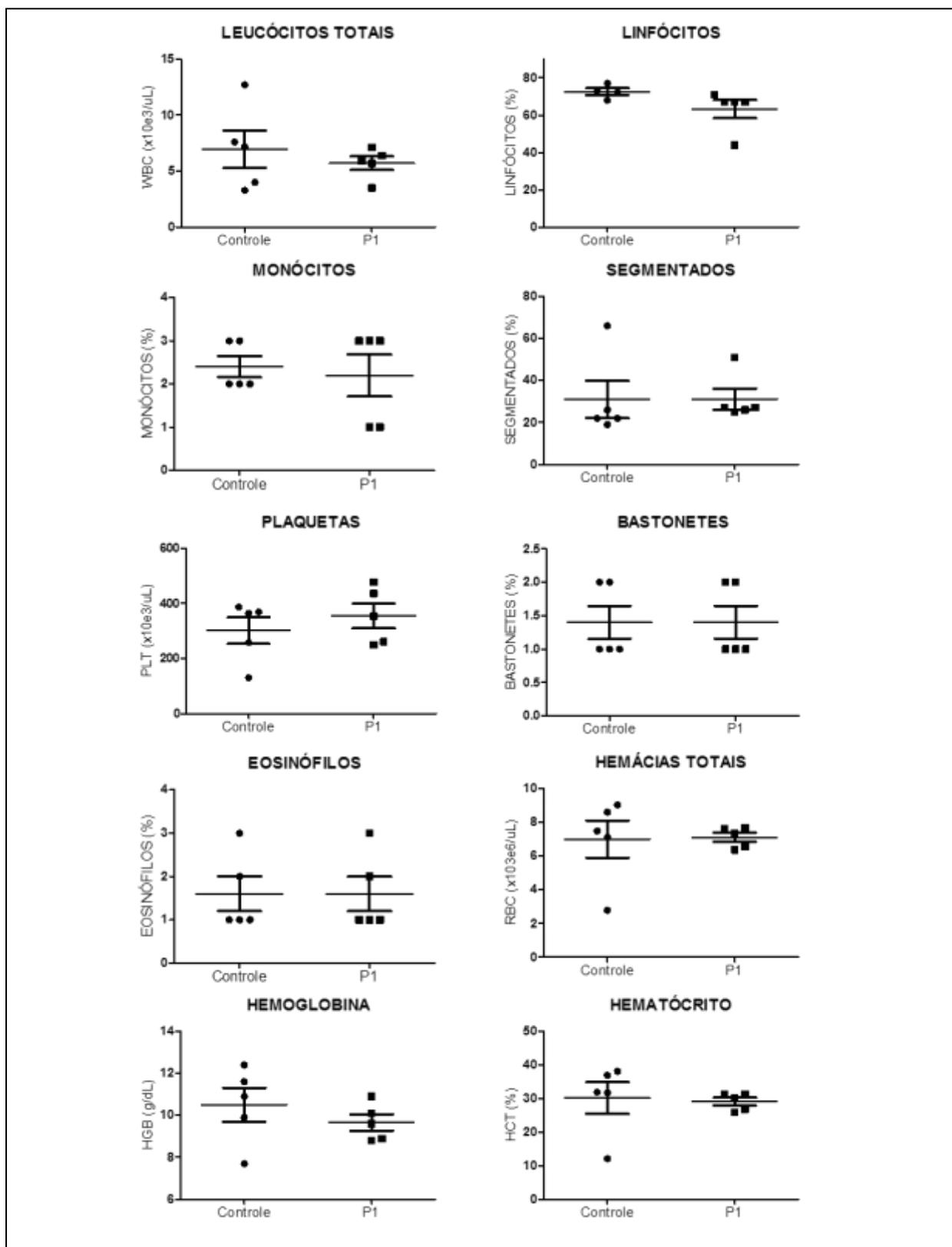


FIGURA 37. Hemograma dos camundongos portadores de melanoma. A figura acima ilustra a análise dos parâmetros do hemograma, após ensaio com camundongos C57BL/6, injetados com células B16-F10, e posterior tratamento (do dia 5 ao dia 14), ou não (controle) com o polissacarídeo P1 em uma concentração de 50mg/kg de peso do animal. Os resultados são relativos a uma quintuplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste t não pareado, com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.13. O TRATAMENTO COM P1 NÃO ALTERA OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os grupos controle e P1 foram submetidos à avaliação dos parâmetros bioquímicos, após tratamentos. Após análise estatística, foi observado que nos parâmetros analisados (ALT, AST, Fosfatase alcalina, Creatinina, Ureia, Colesterol, Triglicerídeos), o tratamento com P1 não levou a nenhuma alteração significativa bioquímica (Figura 38 e Tabela 5). A exceção foi à redução ($p=0,0213$) da ureia no grupo tratado com P1, mas deve-se destacar que os valores encontrados de ureia no grupo P1 estão dentro daqueles de referência ($41,97-60,02 \text{ mg.dL}^{-1}$) aceitáveis para a média da população de camundongos (ALMEIDA et al., 2008).

PERFIL BIOQUÍMICO	CONTROLE	P1	VALOR DE p
ALT (U.L^{-1})	35.53±2.924	29.00±2.806	0.1802
AST (U.L^{-1})	155.4±31.67	164.8±21.03	0.8067
Fosfatase alcalina (U.L^{-1})	79.33±9.034	69.44±2.887	0.2428
Creatinina (mg.dL^{-1})	0.233±0.03333	0.2400±0.0400	0.9132
Ureia (mg.dL^{-1})	60.87±4.656	48.18±1.718	0.0213*
Colesterol (mg.dL^{-1})	72.23±9.773	62.52±3.432	0.3374
Triglicérides (mg.dL^{-1})	56.05±7.194	70.86±5.225	0.1310

TABELA 5. Perfil bioquímico dos camundongos tratados ou não com P1. A tabela acima ilustra a análise do perfil bioquímico, após ensaio com camundongos C57BL/6, injetados com células B16-F10, e posterior tratamento (do dia 5 ao dia 14) com o polissacarídeo P1 em uma concentração de 50mg/kg de peso do animal. Os resultados são relativos a uma quintuplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste t não pareado, com significância de * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

Adicionalmente a estes dados, foram observadas outras características nos animais, durante os experimentos. O grupo controle apresentou menor mobilidade, piloereção, olhos parcialmente fechados, quando comparados ao grupo P1 que não apresentou estes efeitos (dados não mostrados). Nota-se que ao longo do experimento estes efeitos se agravam. Outros efeitos adversos, como a diarreia não foi observado em nenhum dos grupos analisados.

Esse conjunto de dados sugere que o tratamento com P1 não provoca efeito adversos nos animais tratados, o que sugere que é um tratamento promissor e seguro.

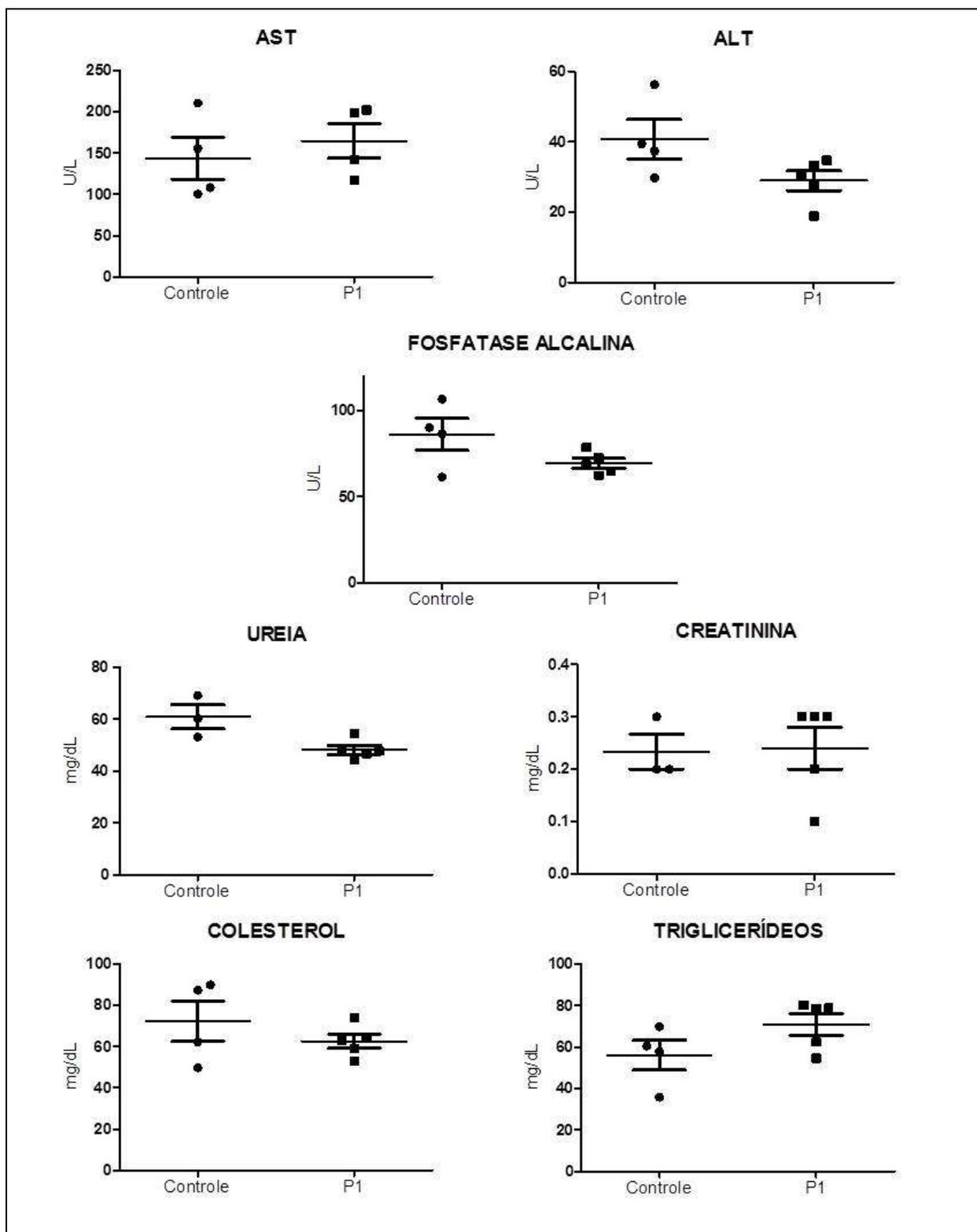


FIGURA 38. Perfil bioquímico dos camundongos tratados ou não com P1. Hemograma dos camundongos portadores de melanoma. A figura acima ilustra a análise dos parâmetros do hemograma, após ensaio com camundongos C57/BL6, injetados com células B16-F10, e posterior tratamento (do dia 5 ao dia 14), ou não (controle) com o polissacarídeo P1 em uma concentração de 50mg/kg de peso do animal. Os resultados são relativos a uma quintuplicata experimental. Os ensaios foram submetidos à análise estatística por teste t não pareado, com significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Estes resultados, mais uma vez, demonstram o efeito antitumoral do P1 sobre melanoma em camundongos. Assim após a visualização deste efeito passou-se então a investigar um possível mecanismo de ação desse polissacarídeo.

Visto que galectinas modulam a progressão tumoral (AHMED; ALSADEK, 2015; LIU; RABINOVICH, 2005), passou-se então a avaliar a participação da galectina-3, empregando-se modelo de camundongos “knockout” para galectina-3, neste efeito de diminuição do volume tumoral causado por P1.

5.14. P1 ATUA VIA GALECTINA-3

Considerando que o polissacarídeo P1 é uma manogalactana e por outro lado as galectinas são ligantes de galactose, o próximo passo foi investigar se o efeito de P1 pode ser mediado via galectinas.

Vale destacar que galectinas é uma família de lectinas, que são proteínas ligantes de carboidratos, que reconhecem glicoconjugados presentes na superfície celular e na matriz extracelular (LIU e RABINOVICH, 2005).

Por outro lado, sabe-se que galectinas extracelulares induzem expressão de MMP-9 em melanoma (DANGE; AGARWAL; KALRAIYA, 2015), e também que as galectinas possuem grande influência sobre o processo tumoral (LIU; RABINOVICH, 2005; RADOSAVLJEVIC et al., 2012).

Para este estudo, foi utilizado um modelo de camundongos *knockout* para Galectina-3 (linhagem C57BL/6 GAL-3/KO), que não expressam galectina-3.

Quando se comparam todos os grupos (Figura 39), os resultados obtidos foram muito interessantes, e para melhor entendimento, eles serão abordados separadamente nas demais figuras.

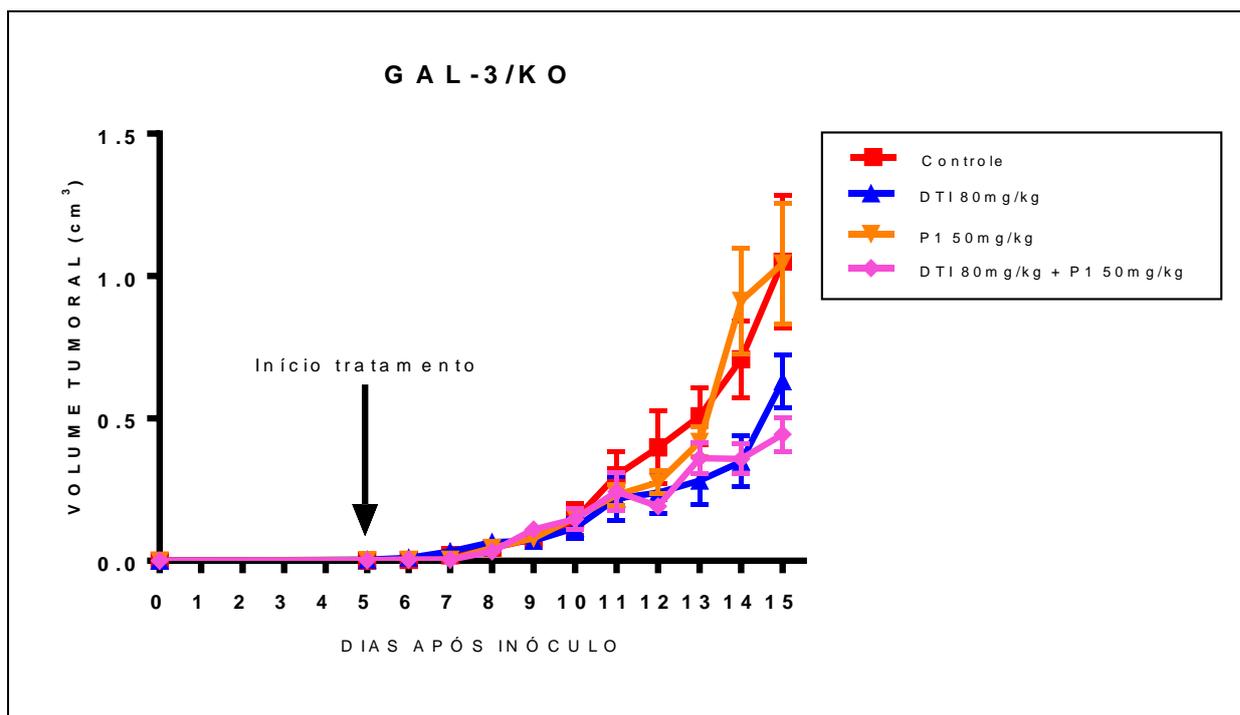


FIGURA 39. Evolução tumoral em linhagens de camundongos deficientes de galectina-3. A figura acima ilustra a representação da evolução tumoral após ensaio com camundongos deficientes de galectina-3 (produção), inoculados células B16-F10, e posterior tratamento ou não com o polissacarídeo P1 (50mg/kg de peso do animal); com Dacarbazina (DTI) (80mg/kg de peso do animal); ou DTI (80mg/kg de peso do animal) + P1 (50mg/kg de peso do animal). Resultado de um experimento com n= 5 (para cada grupo).

Quando comparados os grupos controle e P1, no caso dos animais selvagens (WT) (Figura 32 – gráfico repetido aqui na Figura 40) visualizou-se uma redução tumoral significativa nos grupos tratados com P1 (conforme apresentado anteriormente). Surpreendentemente, quando analisado os mesmos grupos nos animais deficientes de galectina-3 (Figura 40), este efeito antitumoral de P1 não foi mais visualizado.

Outra abordagem foi a análise do efeito do quimioterápico (Dacarbazina), que anteriormente já havíamos mostrado que possuía ação similar ao P1 e que quando combinados, havia uma ação conjunta (Figura 34 – gráfico repetido aqui na Figura 41).

Interessantemente, quando um ensaio similar foi realizado, mas nos animais deficientes de galectina-3 (Figura 41), pode-se verificar que DTI comparado ao controle, também (como no grupo WT) leva a uma redução do volume tumoral ($p=0,0420$), pois não age via galectina-3.

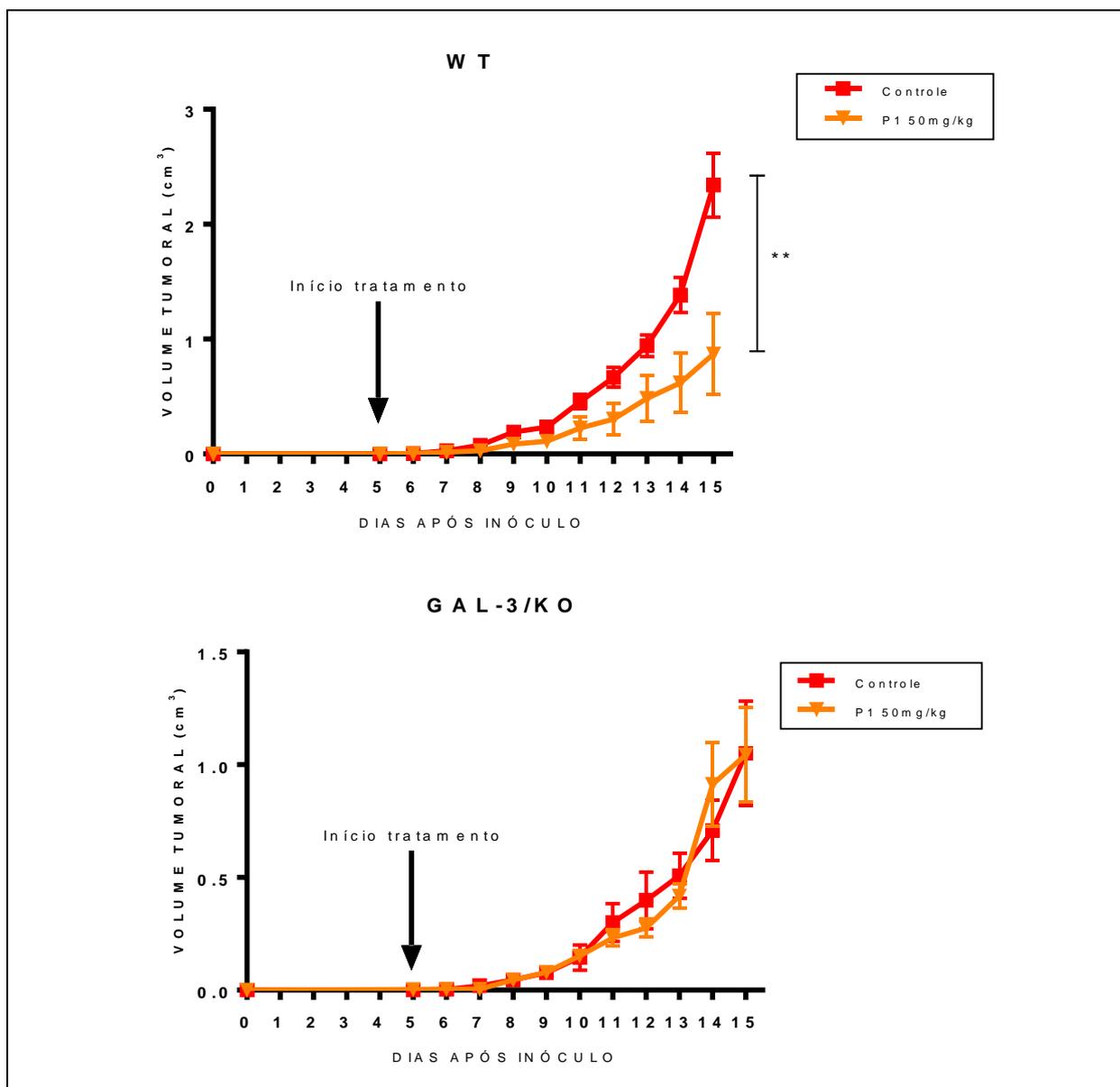


FIGURA 40. Comparação das linhagens de camundongo WT e GAL-3/KO quanto ao efeito do P1 em relação ao controle. A figura acima ilustra a evolução tumoral após ensaio com camundongos, inoculados células B16-F10, e posterior tratamento (do dia 5 ao dia 15) com o polissacarídeo P1 (50mg/kg de peso do animal) em camundongos C57BL/6 (selvagem – WT) ou deficientes para galactina-3 (GAL-3/KO)

Da mesma forma (Figura 41), quando se comparam os grupos controle e DTI+P1 ($p=0,0098$) também há uma redução.

No entanto, nesses animais deficientes de galectina-3 (Figura 41), a combinação de DTI+P1 quando comparada com a ação de DTI utilizada isoladamente, não mostrou nenhuma diferença significativa ($p=0,0977$), diferente de quando observado no grupo de animais selvagem.

Esse dado mostra, de forma interessante (Figura 41), que P1 não tem efeito adjuvante nesses animais deficientes (como visualizado nas figuras 36, 37, 38), e mostra que esse polissacarídeo necessita de galectina-3 para sua ação antitumoral.

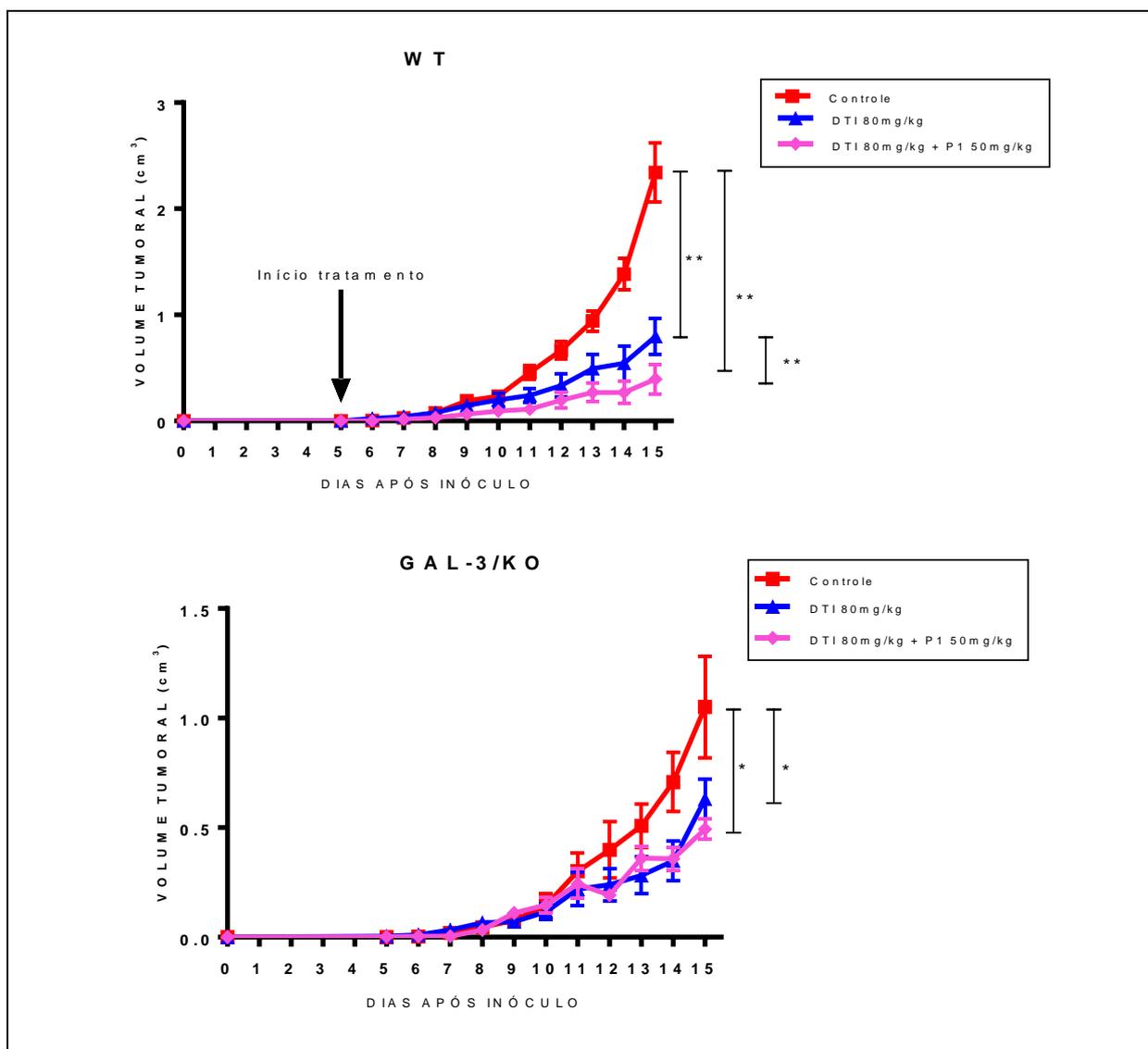


FIGURA 40. Evolução tumoral em linhagem C57BL/6 GAL-3/KO. A figura acima ilustra a representação da evolução tumoral, após ensaio com camundongos, inoculados células B16-F10, e posterior tratamento (do dia 5 ao dia 15); com Dacarbazina (DTI) (80mg/kg de peso do animal); SAC (50mg/kg de peso do animal) + P1 (50mg/kg de peso do animal); ou DTI (80mg/kg de peso do animal) + P1 (50mg/kg de peso do animal); controle (não tratado).

Estes resultados demonstram um importante achado, pois se pode observar a perda da atividade antitumoral, que o P1 tinha demonstrado nos animais selvagens, se perdeu quando se avaliou esta ação nos animais *knockout*.

Adicionalmente, o efeito antitumoral adjuvante, apresentado nos animais selvagens, quando associado P1 à DTI também foi perdido, demonstrando assim que o mecanismo de ação do P1 está correlacionado via galectina-3.

6. DISCUSSÃO

Uma característica que define o câncer é o rápido crescimento de células anormais, que atingem outros locais, além dos seus limites habituais de origem, e então podem invadir outras partes do corpo, se espalhando para outros órgãos, num processo conhecido como metástase, sendo esta a principal causa de morte em pacientes acometidos por essa doença (WHO, 2016). Para que ocorra a metástase, as células de câncer necessitam migrar e invadir novos tecidos, e para isto são necessários diversos eventos celulares e extracelulares (ZHOU et al., 2015).

Neste contexto destaca-se o rápido desenvolvimento do câncer de pele do tipo melanoma, foco deste trabalho. Ainda, chama a atenção que o melanoma, quando em estágio avançado, torna-se praticamente incurável, pois os tratamentos atuais possuem baixa resposta e muitos efeitos colaterais, o que justifica a busca por novos compostos que sejam mais eficientes e com reduzidos efeitos colaterais.

Nesse sentido, vale destacar o trabalho com produtos naturais, pois apresentam efeitos farmacológicos diretos *in vitro* e *in vivo* sobre melanoma (ALQATHAMA; PRIETO, 2015). Mais especificamente, polissacarídeos obtidos de cogumelos comestíveis apresentam ação antitumoral sobre diversos cânceres, como o de rim (YANG et al., 2013), de mama (NOVAES et al., 2011) e melanoma (HUNG et al., 2012). Vale destacar que a maioria desses trabalhos correlaciona esse efeito antitumoral dos polissacarídeos com a citotoxicidade direta, diminuindo a viabilidade e gerando apoptose nas células tumorais (IVANOVA et al., 2014; MA et al., 2014; REN et al., 2016; SRINIVASAHAN; DURAIRAJ, 2015).

Mas em oposição a esta ideia, há dados na literatura que demonstram que polissacarídeos (obtidos de *Pleurotus ostreatus*, p.ex.) podem apresentar efeito antitumoral, sem causar citotoxicidade (TONG et al., 2009). Como exemplo, vale salientar um polissacarídeo sulfatado, isolado a partir de algas, que exibiu atividade antitumoral em camundongos, em modelo de sarcoma 180 e de melanoma. Esse composto levou a inibição da migração e da invasão celular, cuja atividade foi associada à redução da expressão de MMP-9, mas sem apresentar citotoxicidade. Além disso, demonstraram em ensaios *in vivo* que após injeções intraperitoniais do polissacarídeo, houve uma redução significativa de nódulos metastáticos na

superfície pulmonar dos camundongos portadores de melanoma. Concluíram assim que este composto é antitumoral, mas não citotóxico (ABU et al., 2015).

É nesse contexto que nosso grupo de pesquisa vem despendendo esforços, trabalhando com polissacarídeos de diversas origens, sendo obtidos de animais (heparina e sua forma fracionada), bem como de fontes naturais, como de algas marinhas (fucanas) e de cogumelos. Como já mencionado, nossos dados anteriores (BISCAIA, 2012) mostraram que o polissacarídeo P1 não é citotóxico, mas é capaz de alterar a capacidade de invasão tumoral. Assim, o presente trabalho, buscou avaliar duas vertentes principais, uma abordagem celular, para entender o mecanismo que P1 desencadeia nas células e leva à inibição da invasão celular e outro, com uma abordagem *in vivo*, observando se P1 pode ter efeito sobre o modelo de tumor sólido.

Quanto à abordagem celular, os resultados foram muito promissores e mostram claramente, que além de alterar a capacidade de invasão celular, o tratamento com P1 resulta também na diminuição da capacidade de migração (Figura 25). Esses dados, em conjunto com resultado previamente obtido (BISCAIA, 2012) que mostrava um aumento do espraiamento celular, sugerem fortemente que P1 altera características marcantes do perfil metastático das células de melanoma murino em cultura, pois se sabe que para uma eficiente metástase as células precisam reorganizar o citoesqueleto, alterar os contatos focais com a MEC e com as células do estroma circundantes, gerando assim um aumento da motilidade celular (ORGAZ; SANZ-MORENO, 2013).

As análises moleculares mostraram que o tratamento com P1 levou a um aumento das integrinas $\alpha_5\beta_1$, β_1 e da proteína acessória talina (Figura 26), o que poderia explicar, pelo menos em parte, o maior espraiamento observado para as células tratadas com o polissacarídeos, tendo em vista que a adesão celular realizada pelos melanócitos no microambiente tumoral é importante para a manutenção da homeostase da pele, como discutido anteriormente (HAASS; SMALLEY; HERLYN, 2004). Além disso, a interação das células com os componentes da MEC é mediada por integrinas, mas internamente necessita de proteínas acessórias, como a talina. Vale destacar que esta interação celular com o microambiente tumoral é em grande parte responsável pela progressão tumoral (HAMIDI; PIETILÄ; IVASKA, 2016).

Outra abordagem importante foi a análise dos Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos, porque são moléculas importantes para a adesão, motilidade e invasão celular. Essa análise revelou que houve uma diminuição da expressão gênica, tanto do sindecam-1 (um PGHS da membrana plasmática), quanto do perlecam (PGHS da MEC) (Figura 27), proteoglicanos que são superexpressos no melanoma. No entanto, quando foi avaliada a quantidade de heparam sulfato, surpreendentemente, houve um aumento. Essa aparente contradição, pode ser explicada quando se analisou as moléculas que remodelam os PGHS, atuando como *shedases* (liberando o ectodomínio) ou clivando a parte sacarídica (heparanase). Houve uma menor expressão tanto da MMP-9 (uma *shedase*) (Figura 28), quanto da heparanase (Figura 29). Esse conjunto, isto é, menor expressão de PGHS e menor degradação (tanto da parte proteica, quanto da porção sacarídica), resultaram na maior quantidade de heparam sulfato, uma molécula conhecida por atuar, entre outros processos, na adesão celular.

Vale destacar que muitos trabalhos na literatura relatam que proteoglicanos possuem ação moduladora na progressão do câncer, invasão e metástases, regulando o microambiente tumoral (IOZZO; SANDERSON, 2011). Ainda, mostram que são moléculas essenciais para a integridade da MEC e da superfície celular, se ligando a fatores de crescimento e citocinas, bem como com seus fragmentos, contribuindo para a invasão celular (ROY; MARCHETTI, 2009). Uma menor produção de PGHS, bem como menor degradação desses compostos, pode ser interpretada com bons prognósticos.

Para entender a relevância das alterações causadas em proteoglicanos, vale resgatar que o sindecam é um proteoglicano constitutivo de membrana plasmática, é capaz de interagir com moléculas presente na superfície de outras células, bem como em componentes da matriz extracelular, como colágenos e fibronectina. Assim, são importantes nos processos de proliferação celular, adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (LOPES; DIETRICH; NADER, 2006; PORCIONATTO; NADER; DIETRICH, 1999).

Sindecam-1 modula processos-chave da tumorigênese, pois ele é capaz de interagir com diversos fatores de crescimento, como o fator pró-angiogênico VEGF. Essa interação contribui para o fenótipo angiogênico de células endoteliais no mieloma múltiplo (LAMORTE et al., 2012).

Outros estudos com sindecam-1 e melanoma, demonstraram que ele se acumula nos vasos e na MEC do tumor. Orecchia e colaboradores (2013) desenvolveram um anticorpo específico para o ectodomínio do sindecam-1, e após os experimentos verificaram que o bloqueio da porção extracelular do sindecam-1 resultou em uma atividade antitumoral “in vivo”, reduzindo o crescimento tumoral e angiogênese, pois inibiu a ligação do VEGF em seu receptor.

Assim os resultados de redução da expressão gênica de sindecam-1 (Figura 27) obtidos no presente trabalho são promissores, e eles indicam também uma possível ação antitumoral.

Outra molécula modulada foi o perlecan (Figura 27), que está especialmente relacionado a membrana basal, com o desenvolvimento dos tecidos, diferenciação e angiogênese, medeia interações entre célula e a matriz extracelular; armazena e sinaliza para os fatores de crescimento. Estudos demonstram que perlecan está aumentado em melanoma, regulando o processo de invasão, resultando em uma piora do prognóstico dos pacientes (NIKITOVIC et al., 2014).

Demais autores demonstram que perlecan também regula a adesão celular, inflamação e a angiogênese no câncer, entre outros (GUBBIOTTI; NEILL; IOZZO, 2016).

Autores mostram que perlecan possui atributos angiogênicos e promotores de crescimento, basicamente atuando como correceptores para fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) (SHARMA et al., 1998).

Da mesma forma que o sindecam-1, a redução observada para o perlecan, após o tratamento das células com P1, foi um resultado muito interessante.

Por outro lado, quando se avalia a participação da cadeia sacarídica do PGHS (heparam sulfato), a degradação realizada por heparanase, libera fragmentos que possuem atividade biológica em melanoma, que promovem migração celular e angiogênese (ROY; MARCHETTI, 2009); assim a avaliação dessas enzimas de degradação também foi de grande importância e sua diminuição foi um dado muito promissor, pois contribui para o aumento da quantidade final de heparam sulfato.

Aqui vale ressaltar que as cadeias de heparam sulfato modulam o papel biológico celular, frente a proliferação e metástases tumorais (BERNFELD et al., 1999), uma vez que as cadeias sacarídicas podem sofrer proteólise limitada pela ação de heparanase, removendo a parte sacarídica (HS) da porção proteica,

liberando então fragmentos para o meio. Estes fragmentos de HS também apresentam atividade biológica como a angiogênese, proliferação e diferenciação celular (IOZZO; SANDERSON, 2011; SANDERSON et al., 2005).

Desta maneira, estudos demonstram que essas enzimas que degradam HS tem papel importante nas células de câncer, como na proliferação, invasão, sinalização e metástase (HAMMOND et al., 2014). O aumento da expressão de heparanase está correlacionado com a piora no prognóstico em melanoma, como mostrou um estudo com 81 pacientes portadores de melanoma de mucosa oral, sendo concluído que os níveis de expressão de heparanase são inversamente correlacionados com as taxas de sobrevivência dos pacientes, mostrando que esta enzima é alvo para desenvolvimento de novos fármacos (WANG et al., 2013).

Outro GAG importante para o processo tumoral é o ácido hialurônico (AH), que é um polissacarídeo encontrado na matriz extracelular, e realiza ligações entre as células e a matriz extracelular, o que permite com que a célula realize eventos de migração celular, sendo de extrema importância para a sobrevivência das células. Quando o AH se apresenta em grandes quantidades, sua ligação com seu receptor (CD44) estimula a migração e a formação de novos nódulos tumorais (ICHIKAWA et al., 1999; SIRONEN et al., 2011), piorando o prognóstico do paciente, devido ao aumento do potencial metastático (KUDO *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos na literatura mostram que a maioria do ácido hialurônico presente na MEC, é sintetizada por FAC (fibroblastos associados ao tumor), e isto gera a iniciação da progressão tumoral, via interações de células tumorais-MEC, promovendo assim a metástase (ITANO; ZHUO; KIMATA, 2008; ZHOU et al., 2015)

Vale salientar que o ácido hialurônico é um GAG não sulfatado, presente na MEC é muito importante para a motilidade celular, uma vez que sua ligação com receptores celulares como CD-44 e TLR-4 promovem produção de metaloproteases e invasão tumoral, aumentando a motilidade celular (SIRONEN et al., 2011).

Estudos demonstram que a biossíntese de AH acelera o crescimento do tumor, através do recrutamento de células estromais, angiogênese, linfagiogênese e inflamação; pois o AH constrói uma MEC que é favorável para a motilidade e proliferação das células cancerosas (ITANO; ZHUO; KIMATA, 2008).

Este trabalho mostrou de forma interessante que o ácido hialurônico (AH), diminuiu após o tratamento *in vitro* com P1 (Figura 30). Adicionalmente a isso

também foi observada para o seu receptor (Figura 31), o CD44 (por imunofluorescência e por citometria de fluxo), bem como observou-se diminuição da expressão gênica da sua enzima de síntese (HAS-2) e de suas enzimas de degradação (Hialuronidases-1 e 2).

Ainda, estudos mostram que a baixa expressão de AH, bem como a baixa expressão de HAS-2 e HAS-3 (enzimas que promovem a síntese de AH), foram relacionadas com a melhora do prognóstico de pacientes com câncer (KULTTI et al., 2009).

Por outro lado, a célula tumoral secreta enzimas (hialuronidases) que clivam o AH, liberando fragmentos. Um estudo demonstrou que células de melanoma humano expostas a estes fragmentos de ácido hialurônico levaram a ativação de NFκ-B, seguido por aumento da expressão de MMP-2 e interleucina (IL-8), estes que são fatores que contribuem para a progressão do melanoma. Ainda, fragmentos de AH podem se ligar a TLR-4 e desencadear, via ativação de NFκB a aumento da expressão de MMP-9 (fator pró invasivo) e expressão de citocinas IL-8 (pró-inflamatória) (VOELCKER et al., 2008).

Desta forma, os resultados aqui encontrados corroboram com a literatura, e demonstram que a diminuição deste conjunto do ácido hialurônico, a redução da enzima de degradação, possivelmente reduz o fenótipo das células tumorais, reduzindo assim a malignidade das células tumorais e, portanto explicando em partes a redução da invasão e migração.

Outras enzimas de degradação também se fazem interessantes dentro do processo de progressão tumoral. Destacam-se as metaloproteases (MMPs) as quais representam o maior grupo de proteases que atuam sobre a matriz extracelular (MEC), sendo uma das classes mais estudadas nos processos de progressão tumoral (THEOCHARIS et al., 2016).

As metaloproteases (MMP) são importantes, pois são moduladoras da interação entre o microambiente tumoral e a MEC (MORO; MAUCH; ZIGRINO, 2014), estas exercem ação sobre moléculas importantes no processo de sinalização da progressão tumoral, e ainda são consideradas marcadores tumorais para o melanoma (VÄISÄNEN; KALLIOINEN; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2008).

Vale lembrar que as células de melanoma expressam três tipos de metaloproteases: a MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B) e MT1-MMP

(metaloprotease transmembrana 1 ou MMP-14) (MENG et al., 2008). E altas expressões de MMP-2 são correlacionadas com metástases em melanoma, após um estudo com 157 casos de melanoma humano (VÄISÄNEN; KALLIOINEN; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2008).

A literatura demonstra que a redução da MMP-9, por ação de um polissacarídeo de *Agaricus Murill*, reduziu a migração celular e apresentou efeito antitumoral como a diminuição de nódulos metastáticos em modelo de melanoma murino (NIU et al., 2009). E em células de melanoma, descreve-se ainda a diminuição da invasão e da migração celular, com a diminuição de MMP-2 e MMP-9, após tratamento com polissacarídeos obtidos de cogumelos (LEE et al., 2014).

Diante destes dados, o próximo passo foi avaliar possível modulação da ação das metaloproteases, e novamente os resultados se mostram promissores e corroborando com a literatura, onde o P1 apresenta uma ação muito interessante, com redução da expressão gênica de MMP-9 (Figura 28), podendo explicar parte dos resultados anteriores da invasão celular.

Este conjunto de resultados, claramente evidencia que um composto, não citotóxico, com ação biológica; frente a dinâmica de invasão celular pode estar correlacionado com a diminuição da expressão de metaloproteases, com modulação de específicas moléculas envolvidas na adesão e migração celular, especialmente as integrinas, proteínas acessórias, bem como os PGs e GAGs, e enzimas de degradação, específicos marcadores de progressão tumoral.

Assim, nesta fase do trabalho, após comprovar o efeito *in vitro*, e visto que os resultados foram promissores, o modelo *in vivo* mostra-se adequado para a continuidade do estudo.

A literatura mostra resultados de atividade antitumoral em camundongos portadores de melanoma, de uma fração de um polissacarídeo extraído de um fungo *Ganoderma formosanum*. Este estudo demonstra que o tratamento com este polissacarídeo (100mg/kg de animal, por 12 dias) tem ação de estimular o sistema imunológico e obtêm uma redução significativa do volume tumoral. Sugerem assim que este agente é um possível agente antitumoral (WANG et al., 2014a). Também um polissacarídeo extraído do cogumelo *Pleurotus eryngii*, composto de glucose, manose e arabinose, apresenta efeito antitumoral em células de câncer renal (LIU et al., 2015). Outros autores demonstram que o polissacarídeo de *Pleurotus eryngii*,

composto na maioria de glucose, apresentou atividade antitumoral em câncer de fígado (MA et al., 2014). E polissacarídeos não citotóxicos apresentaram efeitos antitumorais (ABU et al., 2015; TONG et al., 2009). Também uma manogalactana, extraída de *Pleurotus sajor-caju*, apresentou um efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, *in vivo*, em animais *Swiss* (SILVEIRA et al., 2015)

Vale lembrar que, neste trabalho, se apresenta uma composição monossacarídica nova, diferente dos polissacarídeos relatados pela literatura. Aqui temos uma manogalactana parcialmente metilada, não citotóxica, também extraída de *Pleurotus eryngii*. Visto que não há na literatura nenhum trabalho com este composto, buscou-se avaliar se este poderia exercer um papel antitumoral empregando-se o modelo de camundongo C57BL/6.

Nossos resultados *in vivo*, tratando camundongos portadores de melanoma, com P1, através de injeções diárias (por 10 dias) intraperitoniais, mostraram uma redução de 60% do volume tumoral (Figura 32), dos animais tratados, em relação aos animais controle, sendo este um resultando surpreendente.

Estes resultados promissores da ação antitumoral, de um polissacarídeo novo, nos leva a buscar um melhor entendimento do possível mecanismo de ação deste composto. Para tanto estes efeitos poderiam estar diretamente vinculados a alteração de osmolaridade. Sendo este o nosso próximo objetivo.

Para responder a essa pergunta, empregou-se um novo grupo de animais tratados somente com a sacarose. Verificou-se então que o efeito de redução do volume tumoral observado pelo tratamento de P1, não se reproduziu no grupo tratado somente com sacarose (Figura 33). Os animais tratados com a sacarose apresentaram maior desenvolvimento tumoral e o aparecimento de úlceras já no 14º dia de experimento.

O próximo passo foi verificar se a ação de P1 se mantinha quando em presença simultânea da sacarose, empregou-se também outro grupo fazendo a associação de P1 à sacarose. Estes resultados mostraram novamente que o polissacarídeo tem efeito, reduzindo o volume tumoral, em comparação ao grupo tratado somente com sacarose e com o controle, demonstrando de forma muito promissora o efeito antitumoral de P1, com ou sem a presença de sacarose, resultado este de grande relevância científica.

Assim demonstra-se que P1 é um novo candidato para o tratamento antimelanoma. Pois para o tratamento usual do melanoma, utiliza-se uma droga quimioterápica desde 1975 (data da sua aprovação no FDA) a Dacarbazina, sendo um dos tratamentos utilizado mundialmente no tratamento do melanoma (AL-BADR; ALODHAIB, 2016; WILSON; SCHUCHTER, 2016). Mas deve-se considerar que a dacarbazina (DTI) é um agente antineoplásico, que após a ativação no fígado, funciona como um agente de alquilação, tendo ação antitumoral não-específica do ciclo celular (AL-BADR; ALODHAIB, 2016). Porém quando que empregada em ensaios clínicos somente de 15-28% apresenta uma resposta efetiva e menos de 2% tem uma resposta durável, além de resultar em citotoxicidade para as células. Esta, apresenta também insucesso com a tentativa de adição de novos compostos para a melhoria da eficácia, obtendo apenas aumento de efeitos colaterais, diminuição da qualidade de vida e nenhuma melhoria na sobrevivência global do paciente (WILSON; SCHUCHTER, 2016).

Visto que o P1 apresentou ação antitumoral, o próximo passo foi avaliar se este novo composto poderia exercer uma ação similar a um quimioterápico conhecido e desta forma inseriu-se a pesquisa um grupo tratado com Dacarbazina (DTI).

Os resultados obtidos aqui demonstram que a DTI, como esperado, apresenta uma redução tumoral significativa, mas não 100% eficaz. E novamente o P1 quando administrado sozinho, demonstrou um resultado promissor muito parecido com a eficácia da DTI. Neste momento seria muito interessante avaliar se o P1 poderia potencializar os efeitos deste quimioterápico, para tanto um novo grupo foi avaliado, P1 e DTI em conjunto.

De forma surpreendentemente, demonstrou-se que quando associado o P1 à DTI, o efeito adjuvante se estabeleceu, reduzindo ainda mais o volume tumoral destes animais (Figura 34), aumentando a eficácia antitumoral apresentada pelo quimioterápico.

Cabe aqui ressaltar que, o P1 reduz AH, bem como a expressão de seu receptor o CD44 (SIRONEN et al., 2011). Talvez, o P1 possa estar atuando neste mecanismo, reduzindo a resistência a fármacos, e desta forma poderia aumentar a eficácia da DTI. Novos ensaios deverão ser realizados para investigar essa hipótese.

Após estes resultados, passou-se então a analisar a evolução tumoral, através de ensaios de detecção de luminescência pelo sistema *in vivo* (PerkinElmer). E assim dados interessantes foram visualizados (Figura 35).

O grupo controle e sacarose mostram um crescimento regular e com maior intensidade; já os grupos tratados com DTI ou com P1, mostram um crescimento lento. Mas o grupo tratado com DTI+P1 demonstrou de maneira interessante que quando comparados os dias 12 e 15 do experimento, há uma redução da luminescência, e assim redução de células ativas, dado não visualizado na medição com paquímetro de volume tumoral. Assim pode-se sugerir que P1 está demonstrando uma ação de regressão tumoral, possivelmente pela ação de diminuição de metabolismo celular.

Após estes resultados, o próximo passo foi investigar se este polissacarídeo poderia apresentar alguma alteração fisiológica nos animais tratados com P1, como um possível efeito colateral. Para isto, foram avaliados vários parâmetros, como o peso corporal dos animais no início e fim dos experimentos, bem como o peso dos órgãos, o perfil bioquímico sanguíneo dos animais e hemograma completo (Figuras 36, 37 e 38). Após todas as análises, não foi encontrada nenhuma alteração significativa, e assim demonstra-se que o P1 é um polissacarídeo seguro para o uso antitumoral.

Estes dados da literatura corroboram com os achados anteriores (BISCAIA, 2012) obtidos para o P1, e assim demonstra-se a ação antitumoral sem citotoxicidade *in vitro* e ainda sem efeitos adversos *in vivo*. Também dados estes que corroboram com parte da literatura que afirma que polissacarídeos não citotóxicos apresentam efeito antitumoral (ABU et al., 2015; MENG; LIANG; LUO, 2016; TONG et al., 2009), mas não corroboram com a grande maioria dos trabalhos, que traz a necessidade de se obter a citotoxicidade para apresentar esse efeito (ALE et al., 2011; IVANOVA et al., 2014; SHANG et al., 2011; SRINIVASAHAN; DURAIRAJ, 2015; ZONG; CAO; WANG, 2012)

Vale destacar que o microambiente tumoral é composto por fibroblastos associados ao tumor, que produzem, sob estímulo, fatores que inibem ou estimulam o crescimento antitumoral (ZHOU et al., 2015), e também remodelam a MEC, afetando o crescimento tumoral e, bem como estimulando ou inibindo metástases

(LU; WEAVER; WERB, 2012; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010b). Dentro deste contexto uma das moléculas de relevância é a galectina-3.

Vale lembrar que galectinas são lectinas que possuem afinidade de ligação a β -galactosídeos (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; LIU; RABINOVICH, 2005). Uma das galectinas, chamada de galectina-3, desempenha um papel importante na adesão, proliferação, diferenciação, angiogênese e metástases, em múltiplos tumores (NAKAHARA; OKA; RAZ, 2005). Na literatura, um estudo com melanoma murino demonstrou que a ausência de galectina-3 no estroma e parênquima diminuiu a vasculogênese, interferindo na resposta dos macrófagos por sinalização interdependente da via de VEGF e TGF β 1. O microambiente tumoral ausente de galectina-3 apresentou diminuição das áreas vasculares funcionais, e também apresentou um aumento nas áreas de necrose, mostrando diminuição na quantidade de VEGF, na ausência de galectina-3 (MACHADO et al., 2014).

A galectina-3 é uma molécula que apresenta muitos efeitos biológicos, como reações imunológicas, transformação tumoral e metástase (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). O acúmulo de galectina-3 é um mecanismo de adaptação para sobrevivência de células tumorais em hipóxia (IKEMORI et al., 2014). Estudos também demonstraram que a galectina-3 tem ação sobre ativação de integrinas, regulando a invasão tumoral (RADOSAVLJEVIC et al., 2012).

As galectinas são importantes nos processos tumorais, visto que as células tumorais apresentam resistência a apoptose, que pode ser induzida pelos fármacos antitumorais conhecidos, com a ativação de células NK (*natural killer*), o que contribui para a malignidade do tumor. Estudos mostram que muitos tumores, incluindo o melanoma, superexpressa galectina-3, e correlacionam essa molécula com a atividade anti-apoptótica (dependendo da localização da galectina-3) (NAKAHARA; OKA; RAZ, 2005). Ainda, alguns autores sugerem que a galectina-3 é um marcador de progressão em lesões melanocíticas e é um novo marcador de prognóstico em pacientes com melanoma primário (BROWN et al., 2012).

Por isso, justifica-se investigar moléculas que possam estar relacionadas com estas dinâmicas e que possam ter interferência direta ou indireta no microambiente tumoral, sendo assim possíveis candidatas a alvos do P1 e, desta maneira, poderia se ter mais explicações sobre a ação antitumoral deste composto.

Com estas informações, passou-se então a investigar possíveis mecanismos de ação, e como se visualizou um efeito antitumoral tardio (após 7 dias de tratamento), e através das informações já encontradas na literatura, o próximo passo foi procurar moléculas envolvidas em crescimento tumoral e ativação do sistema imunológico. Por isso iniciou-se com um grupo de animais *knouckout* para galectina-3.

Os resultados apresentados neste trabalho, mostraram que os animais *knouckout* para galectina-3, não demonstraram diferença entre o grupo tratado com P1 e o controle; demonstrando assim que a galectina-3 está sim envolvida no processo de diminuição tumoral. Animais *knouckout* (sem a presença da galectina-3) não apresentaram a mesma redução tumoral que os animais selvagens (WT) (Figuras 39 e 40).

Desta maneira quando se comparam os resultados aqui apresentados com a literatura, sugere-se que o P1 é uma molécula promissora, e que pode ter efeito mediado por galectina-3.

Vale lembrar que a angiogênese é um passo importante na progressão tumoral, pois é necessário o fornecimento de oxigênio e nutrientes para o tumor crescer de maneira mais rápida; assim o estímulo da angiogênese associada ao tumor é resultado da ação de citocinas e fatores de crescimento como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (WATNICK, 2012).

Assim os resultados mostram que um composto novo, não citotóxico, capaz de reduzir a capacidade de invasão tumoral *in vitro* (BISCAIA, 2012), exerce ação de redução da migração celular, altera o fenótipo das células de melanoma, resultando em uma diminuição de marcadores de progressão tumoral, além de mostrar claramente que ele possui atividade antitumoral sobre melanoma, com possível regressão tumoral, sem efeitos adversos, com ação adjuvante a um quimioterápico utilizado na clínica, mediado por Galectina-3.

Assim já se iniciou um pedido de patente para a atividade biológica do P1, processo este que está em trâmite na UFPR.

No entanto, vários outros experimentos já foram realizados para melhor entendimento do mecanismo de ação antitumoral do P1 como um todo, e análises já estão sendo processadas para possíveis respostas em breve, como:

- a avaliação da evolução tumoral por ressonância magnética – MRI (*magnetic resonance imaging*);
- a mensuração da vascularização tumoral por ressonância magnética – MRI (*magnetic resonance imaging*);
- a avaliação da quantificação do pH intratumoral em comparação ao tecido normal;
- a marcação de moléculas importantes para o fenótipo tumoral, pela técnica de imunohistoquímica no tumor.

Assim que obtivermos todos esses resultados, esperamos encontrar mais informações sobre o real e completo mecanismo de ação de P1 que leva a redução do desenvolvimento do tumor.

7. CONCLUSÃO

Após as análises dos dados obtidos, e quando comparamos os grupos avaliados, podemos concluir que o tratamento com P1:

- Reduz a migração celular;
- Aumenta as moléculas de adesão celular;
- Leva a diminuição da expressão gênica de *sindecam-1* e *perlecan*;
- Reduz a expressão gênica de *MMP-9*;
- Diminui a heparanase, e como um balanço aumenta o HS do extrato celular;
- Atua no metabolismo do ácido hialurônico, reduzindo a expressão gênica de *HAS-2*, *Hialuronidases-1* e *2*, bem como reduzindo a quantificação de ácido hialurônico, e de seu receptor *CD44*.
- Reduz 60% o volume tumoral, após 10 dias de tratamento *in vivo*;
- Não tem efeito condicionado a diferença de osmolaridade;
- É adjuvante na terapia com *Dacarbazina*;
- Leva a uma possível regressão tumoral, a longo prazo;
- Não apresenta efeitos fisiológicos adversos;
- Tem sua via de atuação mediada por *galectina-3*.

P1 é um novo agente, seguro e apresenta eficácia na terapia contra células de melanoma, ainda maior se adicionado a *Dacarbazina*; sendo sua ação dependente da via de *galectina-3*.

REFERÊNCIAS

- ABU, R. et al. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 4, p. 727–732, mar. 2015.
- ADATIA, R. et al. Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-sense perlecan cDNA. **Annals of Oncology**, v. 8, n. 12, p. 1257–1261, 1997.
- AHMED, H. et al. Galectin-3: A potential target for cancer prevention. **Trends in Carbohydrate Research**, v. 3, n. 2, p. 12–21, 2011.
- AHMED, H.; ALSADEK, D. M. M. Galectin-3 as a potential target to prevent cancer metastasis. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 9, p. 113–121, 2015.
- AL-BADR, A. A.; ALODHAIB, M. M. Dacarbazine. In: [s.l: s.n.]. v. 41p. 323–377.
- ALE, M. T. et al. Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds Inhibit Proliferation of Melanoma Cells and Induce Apoptosis by Activation of Caspase-3 in Vitro. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2605–2621, 13 dez. 2011.
- ALMEIDA, A. S. et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 6, p. 429–432, dez. 2008.
- ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, n. 8, p. 1170–1182, 2015.
- BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 269–280, 20 jan. 2010.
- BERNFELD, M. et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 729–777, 1999.
- BISCAIA, S. M. P. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA “ IN VITRO ” DE POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DOS GÊNEROS PLEUROTUS , LENTINUS E AGARICUS.** [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2012.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease I E r. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014.
- BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol.**, v. 20, n. 3, p. 161–168, 2010.
- BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases : evolution, structure and function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1477, p. 267–283, 2000.
- BROWN, E. R. et al. Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 6, p. 865–874, abr. 2012.
- CANCER AUSTRALIAN. **Melanoma of the skin.** Disponível em: <<https://melanoma.canceraustralia.gov.au/>>. Acesso em: 16 fev. 2017.
- CARDOSO, A. C. F. et al. Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. **Frontiers in Oncology**, v. 6, n. May, p. 127, 2016.
- CHALKIADAKI, G. et al. Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration

through a syndecan-4-dependent mechanism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 6, p. 1323–1331, 2009.

CICHOREK, M. et al. Skin melanocytes: biology and development. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 1, n. 1, p. 30–41, 2013.

COUCHMAN, J. R. Transmembrane Signaling. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, p. 89–114, 2010.

DANGE, M. C.; AGARWAL, A. K.; KALRAIYA, R. D. Extracellular galectin-3 induces MMP9 expression by activating p38 MAPK pathway via lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP1). **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 404, n. 1–2, p. 79–86, 2015.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic Behaviour of Acidic Mucopolysaccharides in Diamine Buffers 1. **Analytical biochemistry**, v. 647, p. 645–647, 1976.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: An open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, n. 4, p. 616–635, 2006.

ELDER, D. E. Pathology of Melanoma. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 229–237, abr. 2015.

FERRO, V. et al. PI-88 and novel heparan sulfate mimetics inhibit angiogenesis. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 33, n. 5, p. 557–562, 2007.

FU, Z.; LIU, Y.; ZHANG, Q. A Potent Pharmacological Mushroom: *Pleurotus eryngii*. **Fungal Genomics & Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 2016.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 72, n. 6, p. 455–482, 2008a.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 72, n. 6, p. 455–482, dez. 2008b.

GANDHI, S. A.; KAMPP, J. Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 6, p. 1323–1335, nov. 2015.

GUBBIOTTI, M. A.; NEILL, T.; IOZZO, R. V. A current view of perlecan in physiology and pathology: A mosaic of functions. **Matrix Biology**, p. 1–14, 2016.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **Journal of Molecular Histology**, v. 35, n. 3, p. 309–318, 2004.

HAMIDI, H.; PIETILÄ, M.; IVASKA, J. The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 9, p. 1017–1023, 25 out. 2016.

HAMMOND, E. et al. The Role of Heparanase and Sulfatases in the Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans within the Tumor Microenvironment and Opportunities for Novel Cancer Therapeutics. **Frontiers in oncology**, v. 4, n. July, p. 195, 2014.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 26 mar. 2000.

HO, M.; KIM, H. Glypican-3: A new target for cancer immunotherapy. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 3, p. 333–338, 2011.

HSU, D. K. et al. Targeted Disruption of the Galectin-3 Gene Results in Attenuated Peritoneal Inflammatory Responses. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 3, p. 1073–1083, mar. 2000.

HUNG, C. et al. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 98–105, 2012.

ICHIKAWA, T. et al. Increased Synthesis of Hyaluronate Enhances Motility of Human Melanoma Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 6, p. 935–939, dez. 1999.

IKEMORI, R. Y. et al. Galectin-3 up-regulation in hypoxic and nutrient deprived microenvironments promotes cell survival. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–12, 2014.

INCA. **ABC do câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer**. Tais Facin ed. [s.l.] Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva, 2012.

INCA. **O que é o câncer? - INCA**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>.

INCA. **Câncer - Tipo Pele Melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao>.

IOZZO, R. V.; SANDERSON, R. D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 5, p. 1013–1031, maio 2011.

IOZZO, R. V.; SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix Biology**, v. 42, p. 11–55, mar. 2015.

ITANO, N.; ZHUO, L.; KIMATA, K. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. **Cancer Science**, v. 99, n. 9, p. 1720–1725, set. 2008.

IVANOVA, T. S. et al. Anticancer substances of mushroom origin. **Experimental Oncology**, v. 36, n. 2, p. 58–66, 2014.

IVASKA, J.; HEINO, J. Cooperation Between Integrins and Growth Factor Receptors in Signaling and Endocytosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 291–320, 10 nov. 2011.

JUNG, J. Y. et al. The Effect of Imiquimod on Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Malignant Melanoma Cell Invasion. **Ann Dermatol**, v. 26, n. 3, p. 363–373, 2014.

JUNG, O. et al. Heparanase-induced shedding of syndecan-1/CD138 in myeloma and endothelial cells activates VEGFR2 and an invasive phenotype: prevention by novel synstatins. **Oncogenesis**, v. 5, n. 2, p. e202, 2016.

KAWAI, J. et al. *Pleurotus eryngii* Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–7, 2014.

KIM, S. et al. Silibinin suppresses EGFR ligand-induced CD44 expression through inhibition of EGFR activity in breast cancer cells. **Anticancer Research**, v. 31, n. 11, p. 3767–3773, 2011.

KUDO, D. et al. Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 321, n. 4, p. 783–787, 2004.

KULTTI, A. et al. 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 11, p. 1914–1923, 2009.

LAMORTE, S. et al. Syndecan-1 promotes the angiogenic phenotype of multiple myeloma endothelial cells. **Leukemia**, v. 26, p. 1081–1090, 2012.

- LEE, J. et al. Syndecan-2 Regulates the Migratory Potential of Melanoma Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27167–27175, 2 out. 2009.
- LEE, K. R. et al. Polysaccharide from *Inonotus obliquus* inhibits migration and invasion in B16-F10 cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 via downregulation of NF- κ B signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 31, p. 2447–2453, 2014.
- LEGATE, K. R. et al. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. p. 397–418, 2009.
- LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIU, F.-T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29–41, 2005.
- LIU, X. et al. Structure characterization and antitumor activity of a polysaccharide from the alkaline extract of king oyster mushroom. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 101–106, 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LOPES, C. C.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 157–160, jan. 2006.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **The Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 20 fev. 2012.
- MA, G. et al. Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Pleurotus eryngii* residue. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 297–305, 2014.
- MACHADO, C. M. ARIA L. et al. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGF β 1-induced macrophages. **Cancer medicine**, v. 3, n. 2, p. 201–214, 2014.
- MARTINS, G. G. et al. Sesquiterpene lactones of *Moquiniastrium polymorphum* subsp . *floccosum* have antineoplastic effects in Walker-256 tumor-bearing rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 228, p. 46–56, 2015.
- MARTINS, R. M. et al. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. **Analytical biochemistry**, v. 319, p. 65–72, 2003.
- MAYO. **MAYO CLINIC - Melanoma**, 2016. Disponível em: <www.mayoclinic.org/diseases-conditions/melanoma/basics/definition/con-20026009>
- MENG, N. et al. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. **Histology and Histopathology**, v. 23, p. 1003–1010, 2008.
- MENG, X.; LIANG, H.; LUO, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydrate Research**, v. 424, p. 30–41, abr. 2016.
- MEYER, K. Chemical structure of hyaluronic acid. **Fed. Proc.**, v. 17, n. 4, p. 1075–1077, 1958.
- MICKE, P.; OSTMAN, A. Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 9, n. November 2015, p. 1217–1233, 2005.

MICKE, P.; ÖSTMAN, A. Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 9, n. 6, p. 1217–1233, 21 dez. 2005.

MORO, N.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. Metalloproteinases in melanoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, p. 23–29, 2014.

MURDOCK, A. et al. Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 12, p. 8544–8557, 1992.

NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. **Apoptosis**, v. 10, p. 267–275, jun. 2005.

NAKATSURA, T.; KAGESHITA, T.; ITO, S. Identification of Glypican-3 as a Novel Tumor Marker for Melanoma Identification of Glypican-3 as a Novel Tumor Marker for Melanoma. v. 10, n. 11, p. 6612–6621, 2004.

NCI - SKIN CANCER. **Genetics of Skin Cancer**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389333>>. Acesso em: 7 nov. 2016.

NIKITOVIC, D. et al. Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 8, p. 2471–2481, 2014.

NIU, Y. et al. A Low Molecular Weight Polysaccharide Isolated from *Agaricus blazei* Murill (LMPAB) Exhibits Its Anti-Metastatic Effect by Down-Regulating Metalloproteinase-9 and Up-Regulating Nm23-H1. **The American Journal of chinese Medicine**, v. 37, n. 5, p. 909–921, 2009.

NOVAES, M. R. C. G. et al. The effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: evidence-based medicine. **Clinics**, v. 66, n. 12, p. 2133–2139, 2011.

ORECCHIA, P. et al. A novel human anti-syndecan-1 antibody inhibits vascular maturation and tumour growth in melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 8, p. 2022–2033, 2013.

ORGAZ, J. L.; SANZ-MORENO, V. Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 26, n. 1, p. 39–57, jan. 2013.

PATEL, S.; GOYAL, A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. **Biotech**, v. 2, n. 1, p. 1–15, 25 mar. 2012.

POLYAK, K.; HAVIV, I.; CAMPBELL, I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. **Trends in Genetics**, v. 25, n. 1, p. 30–38, jan. 2009.

PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Heparan sulfate and cell division. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 32, n. 5, p. 539–44, 1999.

RADOSAVLJEVIC, G. et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. **Immunologic Research**, v. 52, n. 1–2, p. 100–110, 2012.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 17, p. 2713–2722, 2010a.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 17, p. 2713–2722, out. 2010b.

REN, D. et al. Chemical characterization of *Pleurotus eryngii* polysaccharide and its tumor-inhibitory effects against human hepatoblastoma HepG-2 cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 123–133, 2016.

- ROGER H.J. The structure and function of hyaluronate. **Biochem Soc Symp**, v. 20, p. 51–79, 1961.
- ROY, M.; MARCHETTI, D. Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 106, n. 2, p. 200–209, 1 fev. 2009.
- ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126–140, 2010.
- RUCCI, N.; SANITÀ, P.; ANGELUCCI, A. Roles of metalloproteases in metastatic niche. **Current Molecular Medicine**, v. 11, n. 8, p. 609–622, 2011.
- SAMPSON, P. M. et al. Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic acid) production. Evidence for cytokine-regulated hyaluronan (hyaluronic acid) degradation and human lung fibroblast-derived hyaluronidase. **J Clin Invest**, v. 90, n. 4, p. 1492–1503, 1992.
- SANDERSON, R. D. et al. Enzymatic remodeling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: Growth regulation and the prospect of new cancer therapies. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, n. 5, p. 897–905, 2005.
- SCHMERLING, R. A et al. Cutaneous melanoma in Latin America: the need for more data. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 30, n. 5, p. 431–8, 2011.
- SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 29 abr. 2016.
- SHANG, D. et al. A novel polysaccharide from Se-enriched *Ganoderma lucidum* induces apoptosis of human breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 25, p. 267–272, 2011.
- SHARMA, B. et al. Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 8, p. 1599–1608, 1998.
- SHIRAKAWA, H. et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Cancer Science**, v. 100, n. 8, p. 1403–1407, 2009.
- SILVEIRA, M. L. L. et al. Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: Its chemical structure and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 90–96, 2015.
- SIRONEN, R. K. et al. Hyaluronan in human malignancies. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 4, p. 383–391, 2011.
- SKINCANCER. **Basal Cell Carcinoma (BCC)**. Disponível em: <<http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/basal-cell-carcinoma>>.
- SRINIVASAHAN, V.; DURAIRAJ, B. In vitro and apoptotic activity of polysaccharide rich *Morinda citrifolia* fruit on MCF-7 cells. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 190–193, 2015.
- STAJIC, M.; VUKOJEVIC, J.; DULETIC-LAUŠEVIC, S. Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 55–66, mar. 2009.
- TENG, Y. H.-F.; AQUINO, R. S.; PARK, P. W. Molecular functions of syndecan-1 in disease. **Matrix Biology**, v. 31, n. 1, p. 3–16, jan. 2012.
- THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, fev. 2016.

- THIJSSSEN, V. L. et al. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1855, p. 235–247, 2015.
- TONG, H. et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1682–1686, fev. 2009.
- TOOLE, B. P. Hyaluronan in morphogenesis. **Cell & developmental biology**, v. 12, p. 79–87, 2001.
- VÄISÄNEN, A. H.; KALLIOINEN, M.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. **Human Pathology**, v. 39, n. 3, p. 377–385, mar. 2008.
- VOELCKER, V. et al. Hyaluronan fragments induce cytokine and metalloprotease upregulation in human melanoma cells in part by signalling via TLR4. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 100–107, 2008.
- WANG, C. L. et al. Activation of antitumor immune responses by *Ganoderma formosanum* polysaccharides in tumor-bearing mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 22, p. 9389–9398, 2014a.
- WANG, W. et al. Suppression of Tumor Growth by *Pleurotus ferulae* Ethanol Extract through Induction of Cell Apoptosis , and Inhibition of Cell Proliferation and Migration. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. e102673, 2014b.
- WANG, X. et al. Heparanase expression correlates with poor survival in oral mucosal melanoma. **Medical Oncology**, v. 30, n. 3, p. 633, 21 set. 2013.
- WASSER, S. P. Medicinal Mushroom Science: Current Perspectives, Advances, Evidences, and Challenges. **Biomed**, v. 37, n. 6, p. 345–356, 2014.
- WATNICK, R. S. The Role of the Tumor Microenvironment in Regulating Angiogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 12, p. a006676–a006676, 1 dez. 2012.
- WCRF. **WCRF - Worldwide data**. Disponível em: <<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>>.
- WEINBERG, R. A. **The biology of cancer**. 2. ed. [s.l.: s.n.].
- WEISS, L. Early concepts of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 19, n. 3/4, p. 205–217, 2000.
- WHO. **WHO - Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 22 ago. 2016.
- WHO | Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 22 ago. 2016.
- WILSON, M. A.; SCHUCHTER, L. M. **Melanoma**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 167
- WOODS, A.; COUCHMAN, J. R. Integrin modulation by lateral association. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p. 24233–24236, 2000.
- XU, D. et al. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharide isolated from *Pleurotus eryngii*. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 30–36, nov. 2016.
- YANG, Z. et al. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 2, p. 615–620, 2013.

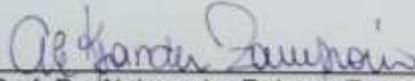
ZHANG, A. Q. et al. Structural elucidation of a novel heteropolysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2239–2244, 2013a.

ZHANG, X. H. et al. Efficacy of combined axitinib with dacarbazine in a B16F1 melanoma xenograft model. **Oncology Letters**, v. 6, n. 1, p. 69–74, 2013b.

ZHOU, L. et al. Perspective of targeting cancer-associated fibroblasts in melanoma. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 8, p. 717–726, 2015.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources : A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395–1410, 2012.

ANEXO II – CERTIFICADO CEUA

	Ministério da Educação UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ Setor de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	
		Nº 746
CERTIFICADO		
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, CERTIFICA que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
CERTIFICATION		
<p>The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".</p>		
PROCESSO: 23075.040348/2013-94	APROVADO: 28/11/2013 – R.O. 10/2013	
TÍTULO: Avaliação da atividade antitumoral de polissacarídeos obtidos de fungos dos gêneros <i>Pleurotus</i> , <i>Lentinus</i> e <i>Agaricus</i> empregando-se estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>		
AUTORES: Célia Regina Cavichiolo Franco, Stelée Marcela Petris Biscaia, Beatriz Santana Borges, Daniel de Lima Bellan, Edvaldo da Silva Trindade, Carolina Camargo de Oliveira, Dorly de Freitas Buchi		
DEPARTAMENTO: Biologia Celular		
 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio Coordenador da CEUA		