



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Viviane Wallerstein Mignone Dantas

**Papel da fucana sulfatada FucSulf I na interação entre células tumorais e o
endotélio *in vitro***

Rio de Janeiro

2012

Viviane Wallerstein Mignone Dantas

**Papel da fucana sulfatada FucSulf I na interação entre células tumorais e o
endotélio *in vitro***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a Dra. Verônica Morandi

Coorientadora: Prof^a Dra. Camila Castro Figueiredo

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

D192 Dantas, Viviane Wallerstein Mignone.
Papel da fucana sulfatada FucSulf I na interação entre células tumorais e o endotélio in vitro / Viviane Wallerstein Mignone Dantas. – 2012.
90 f.

Orientadora: Verônica Morandi.
Coorientadora: Camila Castro Figueiredo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Metástase – Teses. 2. Microambiente tumoral. 3. Heparina – Teses. 4. Linhagem celular tumoral. 5. Endotélio – Teses. I. Morandi, Verônica. II. Figueiredo, Camila Castro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-006

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Viviane Wallerstein Mignone Dantas

**Papel da fucana sulfatada FucSulf I na interação entre células tumorais e o
endotélio *in vitro***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2012

Orientadora:

Prof^a Dra. Verônica Morandi
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora:

Prof^a Dra. Camila Castro Figueiredo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca examinadora:

Profa. Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Profa. Dra. Ana Maria Freire Tovar
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. José Garcia Ribeiro Abreu Júnior
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo seu amor, sua dedicação e seu apoio incondicional, SEMPRE.

À minha irmã, pelos papos de cozinha sobre a “incrível biologia”, pelas infinitas perguntas que aguçavam a minha imaginação criativa de respostas e pela cumplicidade que nos acompanha.

Ao meu pai, pelo amor, carinho e compreensão das minhas escolhas.

À minha família, que está sempre me incentivando e cuidando de mim (e vice-versa).

Ao meu amigo, companheiro e namorado, Marcio, pois sem você ao meu lado esse caminho seria tão mais difícil...

Às minhas meninas, Fe, Ju, Maria, Paulinha, Lua, Babi, o que seria de mim sem vocês?

À minha turma querida 2005/1, vocês são pra vida!

À prof^a Verônica, pela oportunidade e pela orientação ao longo desses anos.

À prof^a Camila por todo o suporte e direcionamento durante este trabalho.

Ao prof. Paulo Mourão, pela oportunidade da colaboração, pela disponibilização dos polissacarídeos utilizados neste trabalho e pelas ideias discutidas ao longo do projeto.

Ao Chico e ao Felipe, meus primeiros parceiros de laboratório, momentos inesquecíveis ao lado de vocês.

Aline, muito obrigada por ser minha primeira parceira de experimentos, sem nunca perder a paciência e nem desistir de mim, mesmo com todos os “ihhhhhh”. Obrigada também pelas gargalhadas juntas, pelos conselhos e por tudo mais que você já sabe.

Marcela e Lailita, as diferenças entre a gente nos completam, quando uma está mal, a outra levanta o ambiente. Quando uma está mais quieta a outra não para de falar. É essa complementariedade que faz com que consigamos manter a cabeça no lugar. Por isso, muito obrigada!

À Fernanda, Gabi e Ceíça, pelos desabafos na hora do almoço, as risadas pra descontrair e por serem sempre tão prestativas. O melhor trio de professoras pra se trabalhar junto!

Chico e Juliana, por toda ajuda e descontração, dentro e fora do lab.

Adelaide, Antônio e Marcella, obrigada pela convivência, espero que apesar das dificuldades e das loucuras que acontecem por aqui, não desanimem, pois no fim acaba dando tudo certo e o resultado final é maravilhoso.

Edward, muito obrigada pela força e pelo apoio que você tem nos dado desde que chegou à Biocel. E também pelas inúmeras risadas.

Paulinha, obrigada por sempre estar disposta a ajudar.

Ao Marcos, pelas conversas na sala de cultura, pelas dicas que tornam o dia a dia mais fácil no laboratório, pela amizade, ah, e é claro, pelos milhares garrações de HUVECs. Sem isso, não existiria trabalho.

Tia Mariléia, agradeço por todo o seu trabalho que torna o nosso trabalho mais organizado. E pelas músicas de rádio de manhã que sempre dão um ânimo pra começar o dia.

Ao Marcos Aurélio, por todo o “aprendizado” que compartilha conosco ao longo desses anos. Graças a você, quero e consigo me tornar a cada dia, uma pessoa melhor rsrsrsrs...

Ao Victor, por ser o gentleman do departamento.

Aos companheiros da Genética (em especial à Rafa) que fazem do departamento um ambiente mais agradável.

À Mônica e Rose, por toda a ajuda.

Às meninas da Prescila, que apesar de estarem no quinto andar, compartilham o dia-a-dia do segundo.

À equipe da Anatomia Patológica do Hospital maternidade Carmela Dutra, pela cessão de cordões umbilicais.

Ao CNPQ, à FAPERJ e à CAPES pelo suporte financeiro.

Vitória

concreto

inerte

fica o corpo

cimento

sustento

rio

mutante

vai o pensamento

crescente

infinito

e vence

vence!

Ana Margarida Mignone

RESUMO

DANTAS, Viviane Wallerstein Mignone. *Papel da fucana sulfatada FucSulf I na interação entre células tumorais e o endotélio in vitro*. 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Biociências)- Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Para formar metástases, as células tumorais devem se desprender do tumor primário e migrar através do endotélio num processo denominado intravasamento. Uma vez na circulação, elas devem aderir ao endotélio do tecido alvo e extravasar para o novo sítio de colonização, onde irão proliferar. A interação das células tumorais com o endotélio é mediada por selectinas, seguida pela interação com integrinas. As células tumorais apresentam um padrão anormal de glicosilação, expressando ligantes de selectinas, formados por polissacarídeos fucosilados, como sialyl Lewis ^{a/x}. Durante o processo metastático, células tumorais secretam diversos fatores de crescimento. Além de modular diferentes tipos celulares que constituem o microambiente tumoral, estes fatores de crescimento também atuam nas células tumorais de forma autócrina, ativando vias de sinalização envolvidas na proliferação e migração celular. Polissacarídeos sulfatados como a heparina, podem atuar como inibidores de P e L-selectinas, além de se ligar a fatores de crescimento, impedindo a ativação de seus receptores. Neste trabalho, avaliamos o papel de fucanas sulfatadas extraídas de diferentes espécies de invertebrados marinhos (*L. variegatus*, *S. franciscanus*, *S. pallidus*, *A. lixula* e *S. droebachiensis*) na modulação da interação entre células tumorais com o endotélio *in vitro* e comparamos seu efeito com o da heparina. Também avaliamos o papel destas moléculas na proliferação de células tumorais. Para isso, utilizamos duas linhagens tumorais de próstata (DU-145 e PC-3) e culturas primárias de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs). Ao avaliar o efeito das fucanas na adesão das células tumorais às HUVECs, observamos que todas as fucanas testadas inibiram a adesão da linhagem DU-145 à monocamada endotelial, enquanto apenas a fucana extraída da espécie *L. variegatus* (FucSulf I) e da espécie *S. franciscanus* inibiram a adesão da linhagem PC-3. A FucSulf I foi uma das fucanas que apresentou maior potencial inibitório nas duas linhagens e foi a única que inibiu a adesão da linhagem DU-145 à matriz subendotelial, não interferindo na adesão da linhagem PC-3. A FucSulf I mostrou-se capaz de diminuir também a migração transendotelial das linhagens tumorais DU-145 e PC-3. A heparina mostrou efeito significativo apenas nos ensaios de transmigração, inibindo este evento de forma similar a FucSuf I. Sabe-se que o VEGF aumenta a permeabilidade endotelial, facilitando a passagem de células tumorais através do vaso. Observamos que as duas linhagens secretam VEGF e que a FucSulf I se liga a este fator. Estes dados sugerem que a interação da FucSuf I com o VEGF pode impedir a ação deste fator nas células endoteliais, diminuindo a migração transendotelial das células tumorais testadas. Também verificamos que a FucSulf I inibiu a proliferação das linhagens celulares na ausência de fatores exógenos ou na presença de soro fetal bovino ou VEGF. Por fim, avaliamos que a FucSulf I interfere na ativação de proteínas específicas de vias de sinalização disparadas por fatores de crescimento. A FucSulf I inibe a ativação da AKT na linhagem PC-3, enquanto nas células DU-145 observamos uma inibição da ativação da ERK. Esses dados indicam que a FucSulf I modula diversas etapas da progressão tumoral e pode ser um potencial candidato para o uso em terapias antitumorais.

Palavras-chave: Células tumorais. Fucana. Endotélio. Metástase.

ABSTRACT

To form metastasis, tumor cells must detach from primary tumor and migrate through the endothelial cell monolayer in direction of the bloodstream (intravasation). Once in the circulation, tumor cells must be able to adhere and migrate across the endothelium (extravasation) towards the target organ, where they will proliferate. Interaction between endothelial and tumor cells is mediated by selectins, followed by the interaction with integrins. Cancer cells frequently exhibit abnormal glycosylation patterns, resulting in the expression of selectins ligands formed by fucosylated polysaccharides, such as sialyl Lewis ^{a/x}. During metastatic process, tumor cells secrete several growth factors which can modulate different cell types that are present in the tumor microenvironment. These growth factors can also mediate autocrine signaling and activate signaling pathways involved in tumor cell proliferation and migration. Sulfated polysaccharides, as heparin, may act as P and E-selectin inhibitors as they may also bind to growth factors and interfere in their receptor activation. In this present work, we evaluated the role of sulfated fucans extracted from different marine invertebrates species (*L. variegates*, *S. franciscanus*, *S. pallidus*, *A. lixula* e *S. droebachiensis*) in the modulation of the interaction between tumor and endothelial cells *in vitro* and compared their effect with heparin. We also investigated the role of these molecules in the proliferation of tumor cells. For that, we used two prostate tumor cell lines (DU-145 and PC-3) and a primary culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). We first evaluated the effect of the fucans in the tumor cell adhesion to HUVECs. All fucans tested were able to inhibit the interaction between DU-145 and the endothelial cells, while only fucans extracted from *L. variegates* (FucSulf I) and *S. franciscanus* were able to inhibit the adhesion of PC-3. FucSulf I showed one of the most striking inhibitory effects in both cell lines and was the only one that inhibited adhesion of DU-145 to subendothelial matrix. It didn't interfere with the adhesion of PC-3 to subendothelial matrix. FucSulf I was also able to decrease transendothelial migration of DU-145 and PC-3. Heparin had significant effect only in the transmigration assays, showing a similar inhibitory potencial in comparison with FucSulf I. VEGF increases endothelial permeability, thus facilitating the migration of tumor cells through the endothelial barrier. We observed that both tumor cell lines secrete VEGF and FucSulf I binds to this factor. These data suggest that the interaction between FucSulf I and VEGF may interfere in endothelial cell's response to VEGF, and decrease transendothelial migration of tumor cells. We also showed that FucSulf I inhibits tumor cell proliferation in the absence of exogenous growth factors or in the presence of fetal bovine serum or VEGF. At least, we showed that FucSulf I interfered in the activation of specific proteins involved in signaling pathways triggered by growth factors. FucSulf I inhibited the activation of AKT in PC-3 tumor cell line, while inhibited the activation of ERK in DU-145 tumor cell line. These results indicate that FucSulf I modulates several steps of tumor progression and may be a potential candidate for use in antitumor therapies.

Keywords: Tumor cells. Fucan. Endothelium. Metastasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012, exceto pele não melanoma, na população brasileira	15
Figura 2-	Etapas da metástase.	17
Esquema 1-	Principais moléculas que atuam como ligantes para integrinas	20
Figura 3-	Isoformas do VEGF.....	23
Figura 4-	Representação das vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK.	29
Figura 5-	Cascata de sinalização MAPK.	30
Figura 6-	A estrutura básica de um resíduo de fucose com ligação 1→3.....	34
Quadro 1 -	Potencial anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados determinado pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT).....	36
Figura 7-	Unidades de repetição das fucanas sulfatadas e da heparina.	37
Figura 8-	Sistema de transmigração celular.....	44
Figura 9-	Inibição da adesão das células tumorais à monocamada endotelial em função de diferentes concentrações da fucana FucSulf I.	50
Figura 10-	Inibição da adesão das células tumorais à monocamda endotelial na presença de polissacarídeos sulfatados.	51
Figura 11-	Inibição da adesão das células tumorais DU-145 à matriz subendotelial na presença da fucana sulfatada extraída de <i>L. variegatus</i> (FucSulf I)...	53
Figura 12-	Inibição da migração transendotelial das linhagens DU-145 e PC-3 na presença da fucana FucSulf I.	55
Figura 13-	Secreção de VEGF pelas linhagens tumorais DU-145 e PC-3.	57
Figura 14-	Ligação de FucSulf I e heparina ao VEGF.....	58
Figura 15-	A FucSulf I inibe a proliferação celular.	61
Figura 16-	A FucSulf I não apresenta efeitos citotóxicos nas linhagens DU-145 e PC-3.....	62
Figura 17-	A FucSulf I inibe a proliferação celular na presença e na ausência de fatores de crescimento exógenos.....	63
Figura 18-	FucSulf I inibe a ativação da ERK e AKT.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT-	quinase serina/treonina
BSA-	albumina de soro bovino
DU-145-	linhagem tumoral de próstata
EDTA -	ácido etileno-diamino-tetra-acético
EGF-	fator de crescimento epidérmico
ELISA-	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK-	quinase regulada por sinal extracelular
FGF-	fator de crescimento de fibroblasto
FucSulf I-	fucana sulfatada extraída de <i>L. variegatus</i>
g-	força g
H ₂ O ₂ -	peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄ -	ácido sulfúrico
HIF-	fator induzido por hipóxia
HRP-	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC-	célula endotelial veia umbilical humana
IL-6-	interleucina 6
KCl-	cloreto de sódio
kDa-	quiloDáton
M-	molar
M199-	meio para cultura de células endoteliais
MAPK-	proteína quinase ativada por mitógenos
MEC-	matriz extracelular
nm-	nanômetro
NaCl-	cloreto de sódio
NaHPO ₄ -	bissulfato de sódio
NFκB-	fator nuclear kappa B
µg-	micrograma
µL-	microlitro
mM-	milimolar
µm-	micrômetro
MLC-	miosina de cadeia leve

MTT-	3-(4,5dimetiltiazol-2-yl)-2,5difenil tetrazólio brometo
OPD-	O-Phenylenediamine dihydrochloride
PBS-	tampão salina fosfato (NaCl 1,37 M, Na ₂ HPO ₄ 5 mM, KCl 40 mM, KH ₂ PO ₄ 1mM ph 6,5)
PC-3-	linhagem tumoral de próstata
PI3K-	fosfatidil-inositol-3-quinase
PKH 26-	fluorocromo vermelho
PMSF-	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF-	fluoreto de polivinilideno
RPMI-	meio de cultura das linhagens tumorais de próstata
SDS -	duodecil sulfato de sódio
SDS- PAGE-	gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio
SFB-	soro fetal bovino
TBS-	tampão tris (NaCl 137mM, Tris 20mM, ph 6,5)
TNF- α -	fator de necrose tumoral alfa
Tris –	tris-(hidroximetil)-aminometano
V-	volts
VEGF-	fator de crescimento de endotélio vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	38
2	MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1	Linhagens tumorais	39
2.2	Cultura de Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVECs)..	39
2.3	Polissacarídeos sulfatados.....	40
2.4	Adesão das células tumorais à monocamada endotelial.....	41
2.5	Adesão das células tumorais em matriz subendotelial.....	41
2.6	Migração transendotelial das células tumorais.....	42
2.7	Ensaio de proliferação celular.....	43
2.8	Avaliação da viabilidade de células tumorais na presença de polissacarídeos sulfatados.....	44
2.9	Avaliação da ligação dos polissacarídeos sulfatados ao VEGF.....	45
2.10	Deteção VEGF no meio condicionado de células tumorais	45
2.11	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (PAGE-SDS)	46
2.12	Western Blotting	47
2.13	Análise estatística	47
3	RESULTADOS.....	48
3.1	Fucanas sulfatadas inibem a adesão das células tumorais ao endotélio...	48
3.2	FucSulf I inibe a adesão da linhagem tumoral DU-145 à matriz subendotelial.....	52
3.3	FucSulf I inibe a migração transendotelial das células tumorais.....	54
3.4	As linhagens tumorais DU-145 e PC-3 secretam VEGF e a FucSulf I se liga ao VEGF.....	56
3.5	A FucSulf I inibe a proliferação das células tumorais e não apresenta efeitos citotóxicos	59
3.6	A FucSulf I inibe a proliferação tumoral na presença e na ausência de fatores de crescimento exógenos	60
3.7	A FucSulf I inibe vias de sinalização envolvidas na sobrevivência e proliferação tumoral	64
4	DISCUSSÃO	66

5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS	78

INTRODUÇÃO

Epidemiologia do câncer

Segundo dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)¹, em 2007, 7,9 milhões de pessoas morreram em decorrência do câncer, correspondendo a 13% do total de mortes ocorridas no mundo no mesmo ano. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetarão de forma significativa o impacto mundial do câncer nas próximas décadas. Estimativas do World Cancer Report (Boyle & Levin, 2008) indicam que esses números podem aumentar em até 50% (15 milhões de novos casos de câncer em 2020), tornando o câncer uma das principais causas de morte em todo o mundo.

As estatísticas mostram ainda, que mais de 70% dos óbitos ocorridos no mundo em decorrência do câncer ocorreram em países em desenvolvimento, o que o torna um dos principais problemas de saúde pública nessas regiões. No Brasil, dados obtidos pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostram que os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de estômago no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (Figura 1) (Ministério da Saúde, 2011).

Os fatores de risco mais evidentes para o desenvolvimento do câncer estão presentes no estilo de vida que permeia a sociedade atual, como por exemplo, o uso de tabaco, o sobrepeso, a baixa ingestão de frutas e legumes, o consumo de álcool, a falta de atividade física, a poluição urbana, entre outros. O relatório apresentado pelo projeto GLOBOCAN em 2008 (Ferlay *et al*, 2008) mostra que mais de 30% dos novos casos da doença poderiam ser prevenidos com a diminuição da exposição a esses fatores.

Assim, a adoção de estilos de vida mais saudáveis associada à implementação de ações governamentais de estratégias para a prevenção, detecção precoce e tratamento de pacientes com câncer podem reduzir e controlar a epidemia do câncer.

¹Fonte: International Agency for research on cancer (IARC). Disponível em < <http://www.iarc.fr/>>, acesso em dez 2011.

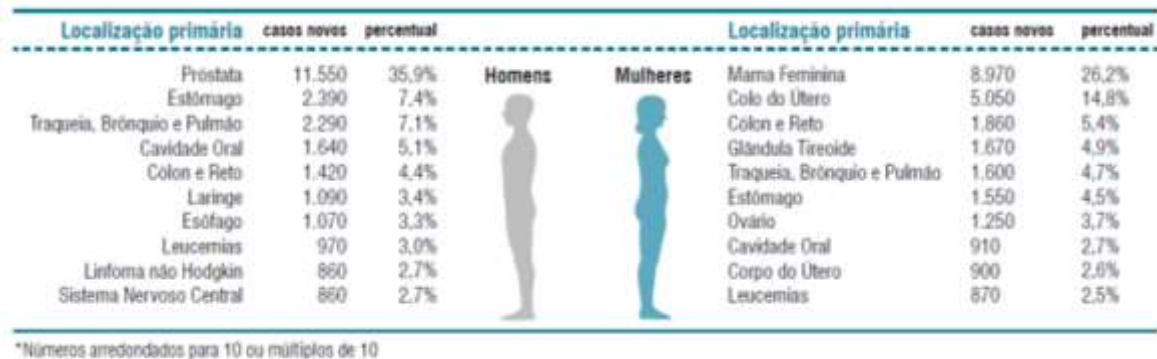


Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012, exceto pele não melanoma, na população brasileira (adaptado de Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2011) .

Câncer de próstata

A próstata é uma glândula cuja principal função é reprodutiva. O líquido prostático que é secretado por ela é responsável pela proteção dos espermatozoides contra a acidez da urina e pela capacitação dos espermatozoides para a fecundação. O antígeno específico da próstata (PSA) é uma glicoproteína do tipo serino protease produzida por algumas células da próstata cuja função é liquidificar o sêmen após a ejaculação. Inicialmente, pensava-se que apenas as células da próstata produziam esta proteína, mas atualmente, sabe-se que o PSA está presente em outros tecidos e fluídos biológicos femininos e masculinos (Diamandis & Yu 1997; Diamandis, 1996).

Níveis séricos elevados de PSA podem indicar alterações benignas ou malignas na próstata, ele é utilizado como marcador tumoral do câncer de próstata, auxiliando no acompanhamento de pacientes em tratamento para este tipo de neoplasia (Dhanasekaran *et al*, 2001).

A Organização Mundial de Saúde² estima que o câncer de próstata representa 10% de todos os casos de câncer e é o mais prevalente entre os homens.

² Fonte: World Health Organization. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>, acesso em dez 2011

É considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de 75% dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. O aumento da expectativa de vida nos países em desenvolvimento nas últimas décadas vem sendo apontado como um dos fatores responsáveis pelo aumento das taxas de incidência nessas regiões. A mortalidade por este tipo de câncer é baixa, uma vez que diagnosticado e tratado nos estágios iniciais da doença a sobrevida média mundial é de 58% (Ministério da saúde, 2009).

Apesar do bom-prognóstico relacionado ao câncer de próstata, em estágios tardios da doença podem ocorrer o desenvolvimento de metástases. As metástases ósseas ocorrem em mais de 80% dos casos avançados de câncer de próstata, o que agrava o quadro clínico e pode reduzir a taxa de sobrevida média dos pacientes para 25% (Sturge *et al*, 2011). Para que a população de células tumorais provenientes da próstata consiga colonizar os ossos, elas precisam invadir a medula óssea. A interação entre as células tumorais e as células ósseas residentes da medula desorganiza a homeostase local, interferindo na reabsorção óssea (Suva *et al*, 2011).

Esse desequilíbrio pode gerar fraturas espontâneas nas regiões afetadas, dificultando ainda mais a recuperação e a sobrevida dos pacientes. O tecido ósseo é o sítio mais comum de colonização, mas as células tumorais de próstata também podem invadir outros tecidos como o pulmão, fígado e cérebro (National Cancer Institute, 2011)³, contribuindo para o agravamento do quadro clínico desse tipo de câncer.

Metástase tumoral

Um grupo coordenado de processos é responsável pela modificação de populações celulares que permite a disseminação tumoral denominada metástase (Liotta *et al*, 1991). Em 1889, Stephen Paget propôs que a metástase dependeria do *cross-talk* entre as células tumorais e os microambientes específicos encontrados em diferentes regiões do organismo, através da teoria da “semente e do solo”. Mais de um século depois, esta teoria ainda fundamenta as novas perspectivas acerca da pesquisa em câncer. Atualmente, sabe-se que o potencial metastático das células tumorais depende da interação com fatores homeostáticos, que promovem o crescimento e a sobrevivência dessas células, assim como a angiogênese e a invasão de um novo sítio (Fidler, 2003).

³Fonte: National Cancer Institute. Disponível em <<http://www.cancer.gov/>>, acesso em dez 2011.

Para formar metástases, as células tumorais devem ter a capacidade de se desprender da massa tumoral primária e migrar pela complexa rede formada pelas proteínas, proteoglicanas e colágenos da matriz extracelular em direção ao leito vascular. Essas células migram através do endotélio, se difundem pela corrente sanguínea e, uma vez na circulação, precisam resistir às forças de velocidade e atrito do fluxo sanguíneo e a apoptose, em particular à *anoikis* (Bodenstine & Welch, 2008). Apenas uma pequena porcentagem das células tumorais circulantes (<0,01%) consegue completar o processo, aderindo ao endotélio e extravasando para o novo sítio de colonização, onde irão proliferar (Jahroudi & Greenberger, 1995) (Figura 2).

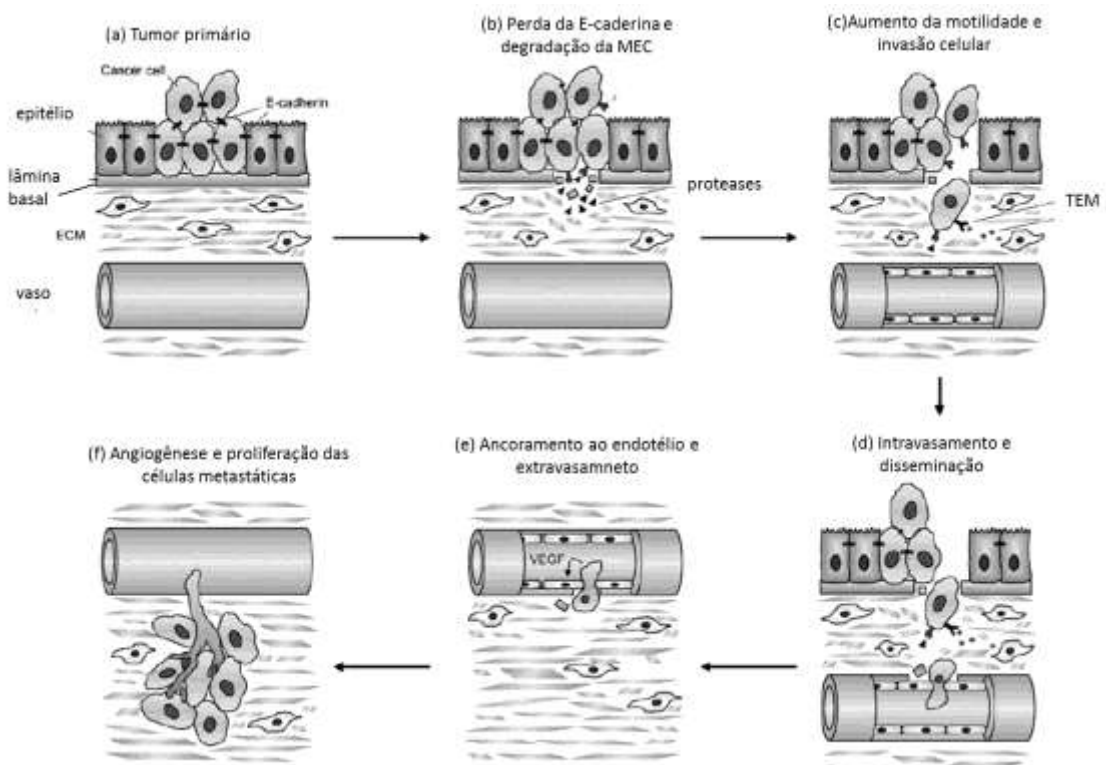


Figura 2. Etapas da metástase (adaptado de Sullivan & Graham, 2007).

Invasão

Como mencionado anteriormente, a primeira etapa da metástase é o desprendimento da célula tumoral do tumor primário e a migração pelo estroma em direção ao leito vascular. Neste processo, moléculas de adesão, proteases e fatores pró-angiogênicos têm, juntos, um papel fundamental para o sucesso do intravasamento das células tumorais e disseminação pela circulação (Brooks *et al*, 2010).

A adesão célula-célula e célula-matriz presente nos epitélios normais restringe a capacidade migratória nesses tecidos. Alterações no padrão de expressão de moléculas de adesão (CAMs) em células tumorais permite a desagregação dessas células e auxilia o processo de invasão (Cavallaro *et al*, 2002).

As caderinas são proteínas de adesão transmembranares dependentes de Ca^{2+} e medeiam a adesão entre células através de interações homofílicas. O reconhecimento estabelecido pelas caderinas é altamente seletivo, o que permite que células de tipos similares mantenham-se unidas e segregadas de outros tipos celulares. A porção intracelular das caderinas se associa aos filamentos de actina através de proteínas adaptadoras como α -catenina, β -catenina e p-120, formando as junções aderentes (Alberts *et al*, 2010). As células epiteliais expressam E-caderina, responsável pela forte junção presente entre essas células auxiliando na formação da barreira epitelial. As células mesenquimais expressam N-caderina, que possuem forças de ligação muito mais fracas que as ligações formadas pela E-caderina, favorecendo o fenótipo migratório dessas células (Leber & Efferth, 2009). Durante a progressão tumoral, pode ocorrer a transição epitélio mesenquimal (EMT), na qual, entre outras alterações, as células tumorais deixam de expressar E-caderina e passam a expressar N-caderina, modificando suas propriedades adesivas (Onder *et al*, 2008). Elas perdem afinidade pelas células epiteliais e ganham afinidade pelas células mesenquimais, facilitando a dissociação da massa celular e migração através do estroma em direção à rede vascular (Yilmaz & Christofori, 2010).

A redução do contato célula-célula induzido pela EMT é acompanhada pelo aumento da interação das células com a matriz extracelular (Levy-Adam *et al*, 2010). Durante a migração celular, a interação com a matriz ocorre principalmente através de receptores transmembranares da família das integrinas. Todas as integrinas são heterodímeros de cadeias α e β , onde a subunidade α está associada não covalentemente a subunidade β . Já foram bem caracterizadas 8 subunidades β e 16 subunidades α , gerando, pelo menos, 22 heterodímeros diferentes (Esquema 1). Durante a progressão tumoral, as interações entre as células tumorais

e a matriz ocorrem principalmente pela integrina $\alpha_5\beta_1$, que possui sítios de ligação para fibronectina, as integrinas $\alpha_6\beta_1$ ou $\alpha_6\beta_4$ que são capazes de se ligar à laminina, a integrina $\alpha_v\beta_3$ se associa à vitronectina e a integrina $\alpha_2\beta_1$ se liga ao colágeno (Friedl & Wolf, 2003).

A migração das células tumorais pelo estroma também depende da expressão de diversas classes de proteases, que contribuem para a degradação e remodelamento da matriz extracelular (Friedl & Wolf, 2008), como serino-proteases, catepsinas e metaloproteases. (Onder *et al* 2008)

Assim, a perda de adesão célula-célula associada ao aumento da interação com proteínas de matriz e à expressão de proteases pelas células tumorais, aumentam seu potencial metastático.

Angiogênese

Conforme observado na Figura 2 (item f), à medida que as células tumorais proliferam e o volume do tumor aumenta, o crescimento tumoral depende da formação de novos vasos, para que haja suprimento de oxigênio e nutrientes suficiente para a manutenção dessas células (Sullivan & Graham, 2007; Zetter, 1998).

A formação da rede vascular pode ocorrer por dois processos diferentes: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é responsável pela formação do primeiro plexo vascular durante a embriogênese. Os angioblastos proliferam, migram e se associam, formando veias primitivas. O desenvolvimento dos vasos prossegue à medida que os angioblastos se diferenciam em células endoteliais, formam o lúmen vascular e depositam lâmina basal ao redor dos vasos (Patel-Hett & D'Amore, 2011). Ao longo da última década, estudos têm mostrado que a vasculogênese não é um processo exclusivo do período embrionário. Em adultos, células progenitoras endoteliais (EPCs), são recrutadas em tecidos isquêmicos para auxiliar no processo de revascularização dessas áreas (Asahara *et al*, 1999; Tongers *et al*, 2010). Ao contrário da vasculogênese que envolve células progenitoras, a angiogênese ocorre pela formação de novos vasos a partir do *sprouting* de células endoteliais de vasos pré-existentes. Esse processo permite o aumento do plexo vascular durante o desenvolvimento e a seu remodelamento ao longo da vida, regulando processos fisiológicos

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
$\alpha 1$	Col I; Lm							
$\alpha 2$	Col I; Lm							
$\alpha 3$	Lm; TSP-1							
$\alpha 4$	VCAM-1; Fn; TSP-1						MAdCAM-1; VCAM-1; Fn	
αE							E-caderina	
$\alpha 5$	Fn							
$\alpha 6$	Lm; TSP-1			Lm				
$\alpha 7$	Fn; Vn; Tn							
$\alpha 8$	Tn							
$\alpha 9$	Fn; Tn; Opn; Fb							
αv			Fb; Vn; OPN; Fn; vWF; Tn; TSP-1		Vn (Opn; Fn)	Fn; Tn		Col I; Lm; Fn; (Vn)
αIIb			Fb; Vm; Fn; vWF					
αL		ICAM-1,2,3						
αM		Fx; Fb; C3bi; ICAM-1						
αX		ICAM-1; Fb; C3bi						
αD		ICAM-3						

Esquema 1 – Principais moléculas que atuam como ligantes para integrinas. Este esquema foi adaptado de Kreis & Vale, 1999 e representa as principais moléculas reconhecidas por diferentes tipos de integrinas: Colágeno I (Col I), Laminina (Lm), Fibronectina (Fn), Tenascina (Tn), Osteopontina (Opn), Vitronectina (Vn), Fibrinogênio (Fb), fator de von Willibrand (vWF), fator X (Fx), molécula de adesão da célula vascular (VCAM), molécula de adesão intercelular (ICAM), componente do complemento C3bi (C3bi), molécula de adesão celular adressina das mucosas (MadCAM), trombospondina 1 (TSP-1) (Kreis & Vale, 1999).

vitais como oxigenação, distribuição de nutrientes, pressão sanguínea, entre outros (Patel-Hett & D'Amore, 2011).

Em adultos saudáveis, o remodelamento vascular através da angiogênese e/ou da vasculogênese não ocorre com frequência, exceto em processos inflamatórios, reparo tecidual e em certas fases do ciclo reprodutivo feminino. Entretanto, a angiogênese pode ocorrer em diversos distúrbios patológicos como crescimento e metástase tumoral, diabetes, artrite reumatoide, entre outros (Liekens *et al*, 2001). Devido ao seu papel na progressão tumoral, Folkman, propôs que a inibição da angiogênese poderia ser utilizado como terapia anti-tumoral (Folkman, 1971). A partir de então, aumentou-se o interesse em elucidar mecanismos envolvidos na regulação da angiogênese.

Estímulos pró-angiogênicos, como fatores de crescimento, são liberados em áreas onde a formação de novos vasos é requerida. Células endoteliais especializadas, denominadas células líderes (ou *tip cells*), são responsivas a fatores de crescimento, como o VEGF e dão início à formação dos *sprouts* (Gerhardt *et al*, 2003). As células endoteliais secretam proteases que levam à destruição da lâmina basal. Em seguida, os pericitos se dissociam do vaso, facilitando a migração das *tip-cells* em direção ao estímulo angiogênico. O estabelecimento do lúmen vascular ocorre à medida em que há a proliferação e o alinhamento das células endoteliais. A associação dos pericitos e a deposição de lâmina basal medeiam a estabilização do novo vaso formado (Ucuzian *et al*, 2010).

Ao contrário da rede vascular normal, os vasos que suprem o tumor formam uma rede altamente desorganizada com veias tortuosas, dilatadas e com excessivos bifurcamentos, gerando regiões de hipóxia na massa tumoral. A exposição às baixas concentrações de oxigênio aumenta o potencial metastático de células tumorais *in vivo*. Nessas condições, há o aumento da expressão de genes críticos para a disseminação tumoral (Sullivan & Graham, 2007). A presença de junções endoteliais frouxas e a membrana basal descontínua formam fenestras nos vasos que levam à hipermeabilidade da vasculatura e aumenta a pressão intersticial facilitando o intravasamento das células tumorais. A predominância de fatores pró-angiogênicos no microambiente tumoral tem sido apontada como principal fator da formação dessa rede vascular caótica, que facilita a saída das células do ambiente hostil do tumor primário em direção a outros sítios de colonização através da circulação (Carmeliet & Jain, 2000).

VEGF

O VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular) compreende uma família de genes que engloba seis diferentes glicoproteínas, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PIGF (*placental growth factor*). O VEGF (VEGF-A) foi identificado pela primeira vez por Senger e Dvorak (Senger *et al*, 1983) como um indutor de permeabilidade vascular secretado pelas células tumorais, sendo então denominado fator de permeabilidade vascular (VPF). Mais tarde, esse fator foi também caracterizado como um mitógeno específico das células endoteliais, sendo então denominado fator de crescimento endotelial vascular, VEGF (Ferrara & Henzel, 1989).

O VEGF-A possui isoformas, resultantes de processamento transcricional alternativo, com 121, 145, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos (Figura 3). A presença do éxon 6-7 confere afinidade por heparan-sulfato e parece ser responsável pela interação do VEGF com os componentes da matriz extracelular (MEC). O VEGF₁₆₅ é a isoforma predominante e tem sua expressão aumentada em diversos tumores sólidos. Ocorre tanto de modo solúvel quanto imobilizado na matriz extracelular (Robinson & Stringer, 2001).

O VEGF imobilizado na MEC constitui um grande reservatório de fator de crescimento que pode ser liberado de modo gradual pela ação de heparanases e de enzimas proteolíticas específicas. Essas enzimas contribuem para a angiogênese pela degradação da MEC, pela liberação do VEGF sequestrado e pela provável regulação da atividade biológica do VEGF (Houck *et al*, 1992).

A resposta celular ao VEGF é desencadeada pela sua ligação a receptores tirosina-quinase, VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. A maior parte dos efeitos descritos para o VEGF são mediados pela ligação das diferentes isoformas do VEGF-A ao receptor VEGFR-2 (Hicklin, 2004). As neuropilinas (NRP-1 e NRP-2) atuam como co-receptores de isoformas específicas de VEGF, aumentando a afinidade dos ligantes aos seus respectivos receptores. Proteoglicanos de heparan sulfato expressos na superfície celular podem atuar como sítios de ligação ao VEGF e modular a ligação do fator de crescimento com seus receptores (Zachary & Gliki, 2001).

As ações biológicas do VEGF nas células endoteliais compreendem o aumento da proliferação, permeabilidade vascular, invasão, migração e sobrevivência celular. Todas essas alterações desencadeadas pelo VEGF estão presentes durante o processo de angiogênese tanto em situações fisiológicas quanto patológicas (Hicklin, 2004).

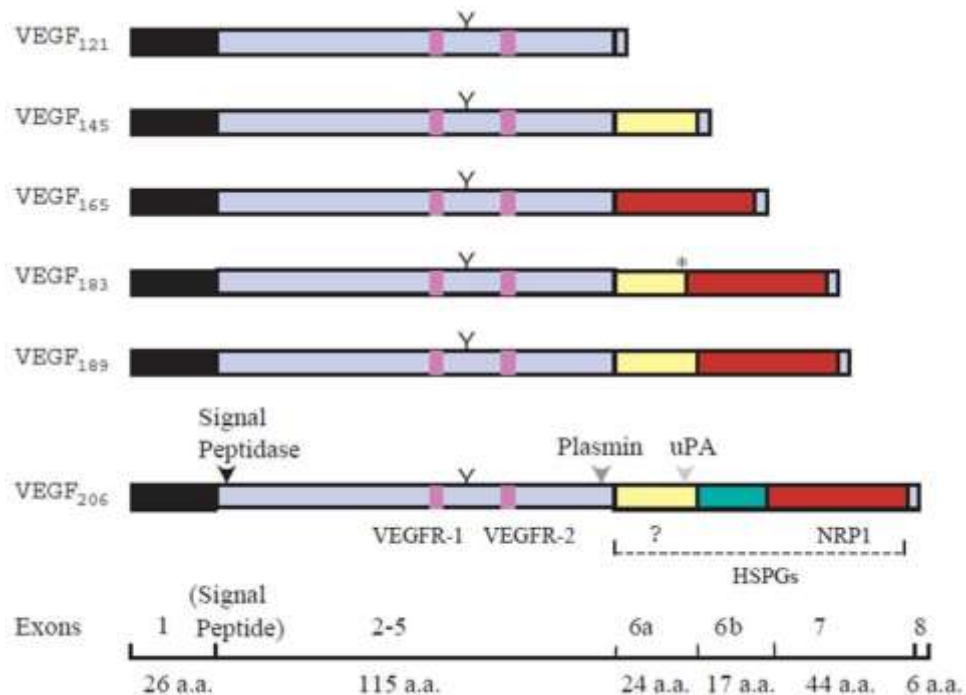


Figura 3. Isoformas do VEGF. As isoformas do VEGF diferem pela presença de sequências codificadas pelo éxon 6 e 7. O tamanho do domínio e os éxons dos quais as sequências são originadas são mostradas na figura. Sítios de interação com receptores de VEGF (VEGFRs), neuropilina 1 (NRP1) e proteoglicanos heparans-sulfato (HSPG) são indicados na isoforma VEGF₂₀₆, assim como alguns sítios de clivagem proteolítica. “?” representa a ligação com componentes da superfície celular e da MEC ainda não determinados (adaptado

A expressão de VEGF é induzida por diferentes fatores de crescimento e citocinas e seus níveis também são regulados pela oxigenação do tecido. A atividade angiogênica induzida por hipóxia é desencadeada pela ativação de HIFs (fatores induzidos por hipóxia). Em condições de hipóxia, o HIF-1 α é estabilizado e acumula-se no núcleo, onde dimeriza com o HIF-1 β e desse modo interage com diversos fatores de transcrição resultando na expressão de numerosos genes relacionados à indução da angiogênese, como o VEGF (Harris, 2002). Por outro lado, níveis normais de oxigenação dos tecidos regulam negativamente a produção de VEGF, causando até a regressão de alguns vasos recentemente formados (Liekens *et al*, 2001).

Fatores de crescimento e as células tumorais.

O rápido crescimento da massa tumoral forma regiões de hipóxia no tumor que induzem a liberação de VEGF, estimulando a angiogênese. Como já descrito anteriormente, a rede vascular presente nos tumores é mal formada e hiperpermeável. Provavelmente, essas características podem ser atribuídas a alterações na produção de VEGF pelas células tumorais (Sullivan & Graham, 2007). O estresse hipóxico também atua como pressão seletiva, favorecendo a expansão de células com potencial de apoptose reduzido (Van Meir 1996), e consequentemente, aumentando a agressividade das mesmas.

Diversos estudos mostram a presença de receptores de VEGF em linhagens de mama e próstata, como VEGFR-1, VEGFR-2 e neuropilinas, indicando que elas respondem de modo autócrino ao VEGF produzido. O VEGF pode atuar como fator de sobrevivência nas células tumorais além de aumentar seu potencial proliferativo e migratório (Chevalier *et al*, 2002; Price *et al*, 2001).

A presença do VEGF no microambiente tumoral tem então um papel fundamental na progressão tumoral. Além de promover um comportamento agressivo do tumor pela ligação a receptores nas células tumorais, ele aumenta a permeabilidade vascular através da ativação de receptores nas células endoteliais, favorecendo a passagem das células tumorais através dos vasos sanguíneos.

O fator de crescimento do fibroblasto (FGF) é representado por uma família de 23 polipeptídeos que compartilham de 19-71% de homologia na composição de aminoácidos. Os FGFs são potentes mitógenos e desempenham importantes funções durante a embriogênese, diferenciação celular e angiogênese (Ornitz & Itoh, 2001).

A atividade biológica dos FGFs depende da sua interação com heparans-sulfato. Essas interações protegem os FGFs da desnaturação térmica e da proteólise, além de limitar a difusão desses fatores de crescimento pelo estroma, uma vez que algumas isoformas do FGF ficam imobilizadas na matriz extracelular pela ligação com heparans-sulfato de matriz. A liberação dessas isoformas depende da ação de enzimas que clivam heparans-sulfato (Ornitz, 2000).

Os receptores de FGF (FGFRs) são do tipo tirosina-quinase, e a sua ativação também depende da presença de heparans-sulfato. Ornitz e colaboradores mostraram que em células tratadas com enzimas de degradação de heparans-sulfato, a ativação do FGFR pelo FGF só ocorre na presença de heparina (Ornitz *et al*, 1992). A ligação do FGF com seus receptores não é suficiente para levar a ativação dos FGFRs. Para isso, é necessário a presença de

heperans-sulfato solúveis ou associados à superfície celular, que quando associados ao FGF, induzem à dimerização dos FGFRs e o desencadeamento da resposta biológica (Plotnikov *et al*, 1999).

Alterações na expressão dos FGFs e seus receptores estão associados a diversos tipos de câncer. Em tumores de próstata, diversas isoformas do FGF são superexpressas, como FGF1, FGF2, FGF6, FGF8 e FGF 17 (Giri *et al*, 1999; Heer *et al*, 2004; Ropiquet *et al*, 2000). A liberação de FGF-2 no estroma tumoral prostático tem um efeito tumorigênico nas células epiteliais adjacentes (Yang *et al*, 2008). Em linhagens humanas de tumor de mama, a ativação do FGFR1 leva ao aumento da proliferação, sobrevivência e potencial invasivo das células (Xian *et al*, 2005).

O fator de crescimento epidermal (EGF) teve sua estrutura primária descrita pela primeira vez em 1972 (Savage *et al*, 1972). Décadas depois, foram identificadas moléculas codificadas por genes distintos e que também se ligavam a receptores de EGF. Estas moléculas geravam respostas mitogênicas e possuíam em comum um motivo de 40-45 aminoácidos, contendo 6 resíduos de cisteína, denominado domínio tipo EGF (Carpenter & Cohen, 1990). A família de receptores de EGF é composta por 4 membros, ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4), todos eles são receptores do tipo tirosina-quinase. Já foram descritos dez ligantes para esses receptores, que podem ser divididos em 3 grupos de acordo com sua especificidade. O primeiro grupo inclui o EGF, anfirregulina (AR) e o fator de crescimento de transformação- α (TGF- α), que se ligam exclusivamente ao ErbB1. O segundo, inclui fator de crescimento epidermal com ligação à heparina (HB-EGF), betacelulina (BTC) e epirregulina (EPR), que se ligam ao ErbB1 e ErbB4. O último grupo inclui 4 membros da família das neuregulinas (NRG1, NRG2, NRG3, NRG4) que se ligam ao ErbB3 e ErbB4. Não há ligantes específicos descritos para o ErbB2, mas ele forma heterodímeros com os outros tipos de ErbBs (Mahtouk *et al*, 2006). As respostas mediadas pela ativação dos EGFRs regulam processos da biologia celular como diferenciação durante o desenvolvimento embrionário, proliferação, sobrevivência e motilidade de diversos tipos celulares (Schneider & Wolf, 2009).

Estudos indicam que o HB-EGF requer a associação com heperans-sulfato para se ligar e ativar seus receptores, induzindo proliferação e migração celular (Takazaki *et al*, 2004; Aviezer & Yayon, 1994). Evidências têm mostrado que o HB-EGF tem sua expressão aumentada em diversos tipos de tumores, como melanoma, glioblastoma e câncer gástrico, sendo o principal ligante de EGFRs encontrado em tumores de ovário (Miyamoto *et al*, 2006).

A ativação de EGFRs induz a produção de VEGF pelas células tumorais, aumentando a agressividade do tumor. Inibidores da atividade quinase desses receptores reduzem a expressão de VEGF e diminuem a migração das células endoteliais em direção às células tumorais (Hirata *et al*, 2002).

Vias de sinalização ativadas por fatores de crescimento – PI3K/AKT e MAPKs.

A via PI3K/AKT (Figura 4) está envolvida na maioria das respostas disparadas por fatores de crescimento. A ligação dos fatores de crescimento e a ativação de seus receptores leva ao recrutamento de uma proteína-quinase específica, denominada PI3K (quinase do fosfatidil inositol 3), para a membrana plasmática. A PI3K ativada, catalisa a transferência de um grupo fosfato do ATP para o fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PIP2), gerando o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 recruta duas proteína-quinases para a membrana celular, a AKT, também denominada PKB, e a PDK1 (quinase dependente de fosfatidil inositol). Após a sua ligação ao PIP3 na face citosólica da membrana, a AKT muda de conformação e expõe resíduos de serina e treonina (serina 473 e treonina 308), que podem ser fosforilados pela PDK1, tornando-a ativada (Liang & Slingerland, 2003). A AKT ativada se dissocia da membrana plasmática e pode fosforilar diferentes proteínas. Os alvos da AKT podem ser divididos em três grupos: proteínas apoptóticas, fatores de transcrição e outras proteína-quinases. A AKT fosforila e inativa diretamente 2 proteínas pró-apoptóticas, a BAD (promotor de morte associado ao Bcl-2) e a caspase-9, promovendo a sobrevivência celular (Song *et al*, 2005). O fator de transcrição NfκB é ativado pela AKT e regula a transcrição de diversos genes que controlam a sobrevivência e proliferação celular. A inativação da glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) pela AKT pode regular a estabilidade e a síntese de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (Manning & Cantley, 2007).

Fatores de crescimento como EGF, VEGF e FGF podem modular a progressão tumoral através da ativação da AKT. Como já descrito, o EGF induz a expressão do VEGF. Este processo depende da modulação da via da AKT, levando a ativação do HIF-1 (Laughner *et al*, 2001). Recentemente foi descrito, em células de tumor de mama, que o FGF controla a transição da fase G₂/M do ciclo celular através da ativação da AKT (Browaeys-Poly *et al*, 2009). Além disso, sabe-se que o VEGF pode atuar como fator de sobrevivência em células de melanoma e aumentar seu potencial proliferativo e migratório, através da ativação da via de sinalização PI3K/AKT (Graells *et al*, 2004).

Outra via de sinalização envolvida nas repostas a fatores de crescimento é a via das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Figura 4). Elas formam uma superfamília de proteíno-quinases que englobam as MAPKK quinases, também conhecidas como RAFs, que ativam as MAPK quinases, denominadas MEK, que tem como alvo as MAPK (Figura 5). A ativação dessas proteínas ocorre com a dupla fosforilação em resíduos de treonina e tirosina. Dependendo do estímulo extracelular, diferentes MAPKs (ERK1/2, JNK1/2/3, p38 quinases e/ou ERK5) podem ser ativadas ao final da cascata de sinalização (Roberts & Der, 2007). Geralmente, a via da ERK é ativada por fatores de crescimento, enquanto as vias da JNK, p38 e ERK5 são ativadas também pelo estresse celular. Além de regular a atividade de outras proteínas diretamente pela fosforilação, como por exemplo, proteínas do citoesqueleto, as MAPKs podem translocar para o núcleo e fosforilar fatores de transcrição, que ativam e regulam a expressão de genes relacionados à proliferação, migração, sobrevivência, diferenciação e angiogênese (Henson & Gibson, 2006; Dhillon *et al*, 2007).

A ligação do FGF-2 ao FGFR e ao heparan-sulfato leva à ativação da ERK e evidências mostram que o próprio heparan-sulfato também pode atuar como receptor do FGF2 e disparar a via das MAPKs. Este fato foi observado em uma linhagem bovina de células vasculares do músculo liso, nas quais o FGFR estava inibido (Chua *et al*, 2004). O VEGF e o EGF também induzem a ativação da via das MAPKs. Mutações em efetores desta via são frequentes em tumores e alteram as respostas desencadeadas pelo EGF, aumentando a sinalização induzida pela ERK (Mendelsohn & Baselga, 2003). Além disso, o aumento da proliferação, sobrevivência celular e migração de células de melanoma em resposta ao VEGF, além de envolver a ativação da AKT, como descrito acima, também depende da modulação das MAPK (Graells *et al*, 2004).

Interações entre as células tumorais e as células vasculares.

As células tumorais são submetidas a um microambiente hostil dentro da circulação e a sua sobrevivência é crucial para o extravasamento e o estabelecimento de novos focos metastáticos. A ativação plaquetária parece ter um papel fundamental na proteção das células tumorais dentro da circulação. A adesão entre plaquetas e células tumorais e a deposição de fibrina formam heteroagregados que dificultam o reconhecimento das células tumorais por células do sistema imune (Gay & Felding-Habermann, 2011). Além disso, estudos morfológicos mostraram a presença de plaquetas e fibrina associadas às células tumorais que

estão ancoradas em regiões de microvasculatura. A associação entre plaquetas e células tumorais circulantes pode ser importante também para o ancoramento das células tumorais ao endotélio durante o extravasamento (Im *et al*, 2004).

Tanto a interação entre as células tumorais com plaquetas quanto com o endotélio é mediada por moléculas de adesão que reconhecem carboidratos expressos na superfície das células tumorais (Brown *et al*, 2006).

Transformações neoplásicas estão associadas ao aumento da expressão de carboidratos na superfície celular, que parecem favorecer o fenótipo invasivo das células transformadas (Dall'Olio & Chiricolo, 2001), uma vez que aumentam a interação das células tumorais com moléculas de adesão do endotélio e das plaquetas.

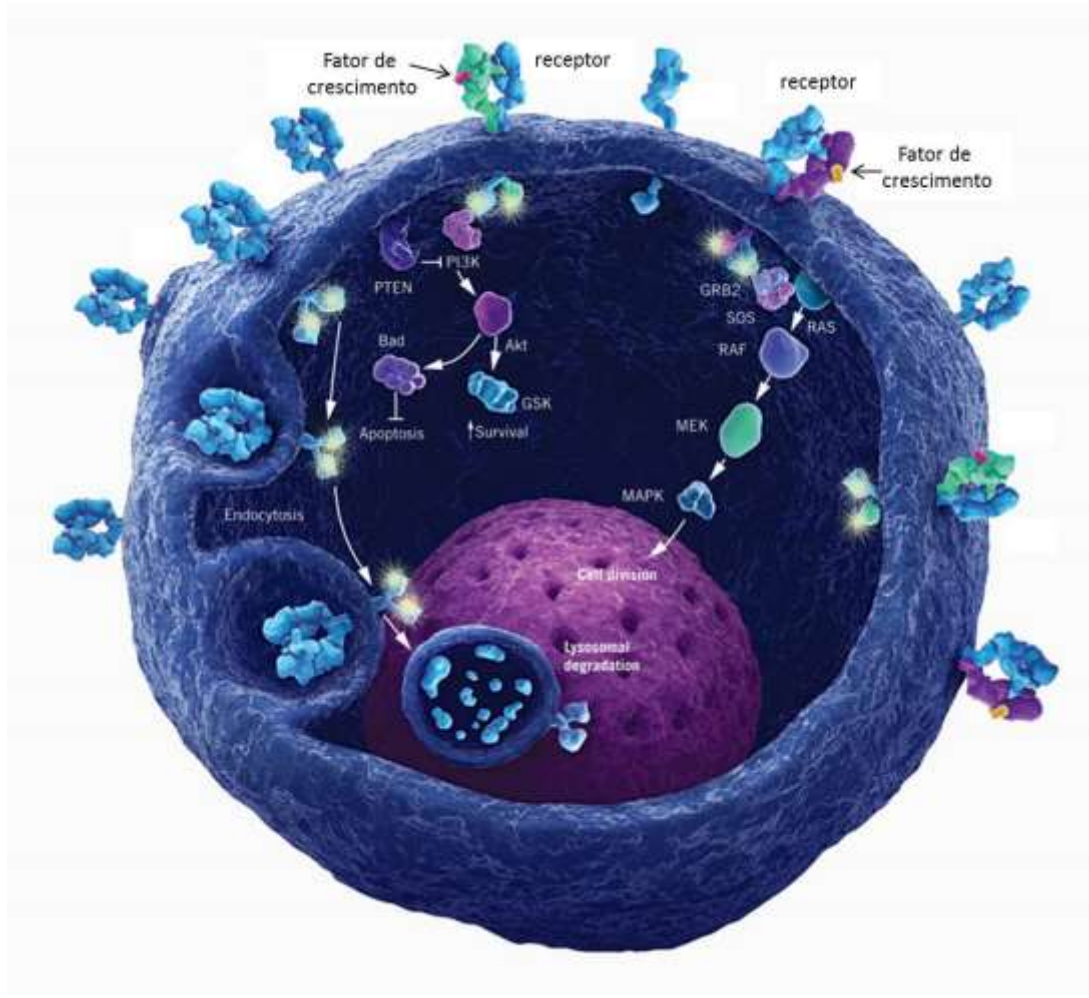


Figura 4. Representação das vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK (adaptado de <http://www.biooncology.com/therapeutic-targets/pi3k/index.html>, acesso em 03/02/2012)

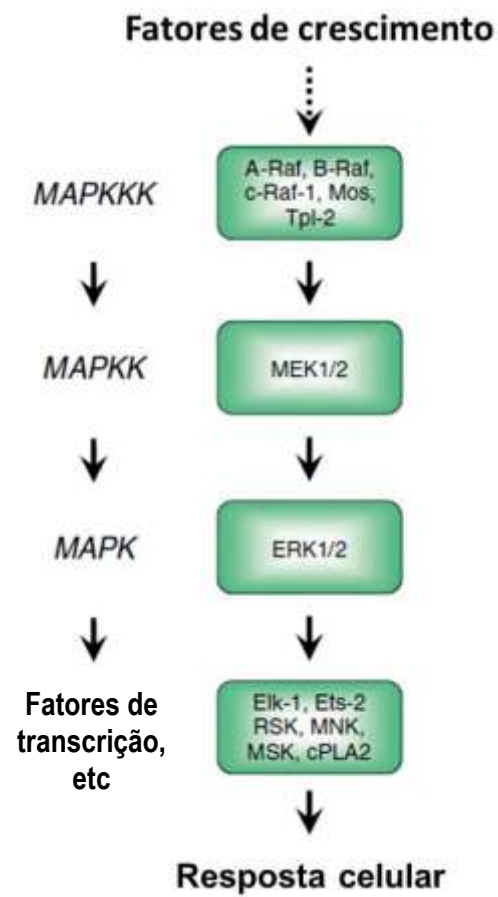


Figura 5. Cascata de sinalização MAPK (adaptado de Roberts & Der, 2007).

O ancoramento das células tumorais ao endotélio e o papel das selectinas.

As células tumorais circulantes devem estabelecer interações com o endotélio para diminuir a sua velocidade na circulação. A formação de ligações transientes entre carboidratos expressos na superfície das células tumorais e selectinas expressas nas células endoteliais leva ao rolamento das células tumorais sobre o endotélio (Krause & Turner, 1999). Essa interação ativa integrinas específicas que medeiam ligações célula-célula e formam ligações mais fortes entre as células tumorais e o endotélio permitindo assim o ancoramento que precede o extravasamento em direção a novos sítios no organismo (Paschos *et al*, 2009).

As selectinas compõem uma família de moléculas de adesão celular transmembranar que medeiam ligações heterotípicas entre seu domínio lectina e carboidratos associados aos seus ligantes. O domínio citoplasmático das selectinas permite que elas também atuem como receptores de sinalização celular (Alberts *et al*, 2010).

A L-selectina é expressa constitutivamente em quase todos os tipos de leucócitos e se associa a ligantes expressos em linfonodos periféricos, no endotélio ativado, em outros leucócitos e em diversos tipos de células tumorais (Kansas, 1996). A interação entre a L-selectina e ligantes expressos no endotélio em locais de ancoramento intravascular das células tumorais parece auxiliar no rompimento da barreira endotelial, facilitando assim a migração transendotelial das células tumorais (Läubli *et al*, 2006).

A E-selectina é expressa nas células endoteliais mediante a estímulos pró-inflamatórios, como TNF- α , e o pico de síntese ocorre entre 4 e 6 horas após a ativação do endotélio (Bevilacqua *et al*, 1987). A ligação da E-selectina a carboidratos expressos na superfície das células tumorais dispara uma resposta intracelular de co-ativação das vias ERK/Src e p38/MLC. A ativação das quinases ERK/Src leva à dissociação do complexo VE-caderina/ β -catenina e a ativação da via p38/MLC leva à formação de fibras de estresse (Tremblay *et al*, 2006). Juntas, essas vias regulam a tensão celular e a integridade das junções endoteliais aumentando a permeabilidade do endotélio. Assim, a presença de ligantes de E-selectina em células tumorais aumenta seu potencial metastático, uma vez que esta interação aumenta a permeabilidade endotelial, favorecendo a saída destas células da circulação.

A P-selectina é estocada nos grânulos-alfa plaquetários e nos corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais. A presença de estímulos como trombina e histamina levam a fusão destas vesículas com a membrana plasmática fazendo com que a P-selectina seja rapidamente expressa na superfície do endotélio ou plaquetas (McEver *et al*, 1989). A expressão de P-selectina também pode ser regulada a nível transcricional pela ativação das células endoteliais

por citocinas como TNF- α e IL-6 (Zhang *et al*, 2011). Como já descrito anteriormente, os heteroagregados formados entre plaquetas e células tumorais formam microembolias que podem facilitar a interação dessas células com o endotélio. Carboidratos expressos na superfície das células tumorais medeiam a interação com as plaquetas e com o endotélio, através da ligação com a P-selectina (Läubli & Borsig, 2010).

As selectinas auxiliam no processo de ancoramento das células tumorais e do extravasamento das mesmas, uma vez que as interações de ligantes tumorais a receptores endoteliais alteram a permeabilidade e até mesmo a integridade do vaso (Miles *et al*, 2007).

Polissacarídeos e a biologia tumoral.

Os polissacarídeos expressos na superfície de células tumorais e presentes nos tecidos-alvo em que essas células irão colonizar são fundamentais para os principais eventos da tumorigênese e da metástase.

Os ácidos siálicos são carboidratos com carga negativa e tem sua expressão aumentada em glicoconjugados presentes em diversos tipos de células tumorais. O aumento da expressão de ácidos siálicos em tumores pode contribuir para a diminuição da adesão celular, pois a presença de cargas negativas na superfície celular pode gerar repulsão entre as células adjacentes, facilitando o descolamento da célula da massa tumoral e a migração pelo estroma (Fuster & Esko, 2005).

Como já descrito, durante a disseminação tumoral pela circulação, as células tumorais estabelecem interações com plaquetas, leucócitos e o endotélio. Essas interações ocorrem pela ligação de carboidratos expressos na superfície das células tumorais com as selectinas. Os polissacarídeos fucosilados como sialyl-Lewis^x e sialyl-Lewis^a são os determinantes mais comuns em ligantes de selectinas. Estudos clínicos mostram que a expressão desses antígenos em células tumorais está diretamente relacionada com a metástase, com a progressão tumoral e com um mau prognóstico (Brown *et al*, 2006).

As mucinas contendo motivos do fator de crescimento epidermal (EGF) são expressas em células tumorais de mama e interagem com receptores de EGF, levando a fosforilação dos receptores mesmo sem a interação com seus ligantes (Hollingsworth & Swanson, 2004). O crescimento tumoral também pode ser regulado diretamente pela interação de polissacarídeos, como heparan sulfato, com fatores de crescimento solúveis, atuando como co-receptores (Savorè *et al*, 2005).

A heparina é um grupo de glicosaminoglicanos composto por polissacarídeos sulfatados de peso molecular variado e é usada a mais de 65 anos como droga antitrombótica. Estudos realizados por Skyner e colaboradores mostraram que polissacarídeos sulfatados, como heparinas e fucoidans, se ligam à P-selectina (Skinner *et al*, 1991). A ligação da heparina com a P-selectina interfere na interação das plaquetas e do endotélio com os determinantes Sialyl Lewis ^{a/x} expressos, por exemplo, nos neutrófilos e nas células tumorais. Nas últimas décadas, a heparina vem sendo explorada pelo potencial anti-inflamatório e anti-metastático (Fritzsche *et al*, 2006).

A heparanase é encontrada em diversos tumores e aumenta o potencial invasivo das células tumorais, pois degrada heparans-sulfato que compõem a MEC, facilitando a migração celular e liberando fatores de crescimento imobilizados na MEC (Ilan *et al*, 2006). Estudos mostram que polissacarídeos derivados de heparina podem inibir degradação de heparans sulfato pela heparanase *in vitro* e assim, diminuir a capacidade metastática das células que expressam essa enzima (Miao *et al*, 1999).

Apesar da sua ação anti-metastática, a utilização da heparina na clínica ainda é limitada devido ao risco de uma hemorragia pela sua ação anticoagulante.

Fucanas sulfatadas

Fucanas sulfatadas extraídas de algas e invertebrados marinhos estão entre os polissacarídeos sulfatados mais estudados. As fucanas são formadas por repetições de L-fucose sulfatada (Figura 6) e são encontradas em macroalgas e em equinodermos, como pepino-do-mar e ouriço-do-mar. A estrutura das fucanas extraídas de algas (também denominadas fucoidans) é bastante complexa e heterogênea, o que torna difícil a sua elucidação estrutural completa (Berteau & Mulloy, 2003). As fucanas encontradas em invertebrados marinhos possuem uma estrutura muito mais simples e homogênea. Elas são formadas por polissacarídeos lineares contendo unidades repetidas de mono, tri ou tetrassacarídeos, que são definidas pelo padrão de sulfatação das estruturas (Mulloy *et al*, 1994).

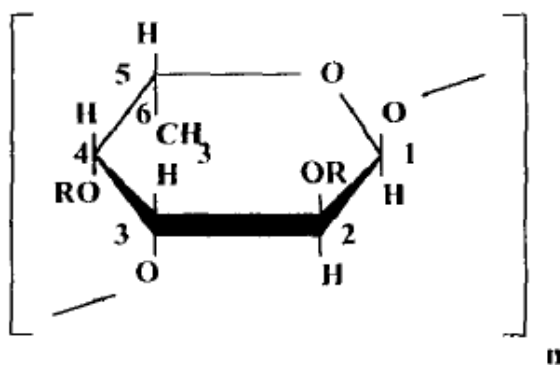


Figura 6. A estrutura básica de um resíduo de fucose com ligação 1→3, presente em diversas fucanas de organismos marinhos. R pode ser hidrogênio, sulfato ou uma cadeia lateral de fucose ou galactose (modificado de Mulloy *et al*, 1994).

As fucanas são encontradas no revestimento corporal dos pepinos-do-mar e pouco se sabe sobre seu papel biológico, mas acredita-se que está relacionado com manutenção da integridade da parede corporal (Mourão & Bastos, 1987). As fucanas de ouriços-do-mar são extraídas do gel que envolve o óvulo do ouriço e são espécie-específicas. Nesse grupo, tanto a fêmea quanto o macho liberam seus gametas na água e a fertilização ocorre de modo extra-corpóreo. Sendo assim, para que a fertilização ocorra com sucesso, a produção e liberação dos gametas dos machos e fêmeas devem ser sincronizados e, uma vez liberados, devem interagir com gametas da mesma espécie, evitando a fertilização cruzada entre duas espécies diferentes (Vilela-Silva *et al*, 2008). As fucanas têm um papel fundamental nesse processo, pois elas induzem a reação acrossômica (mudanças no espermatozóide para que haja a fertilização do óvulo). Como cada espécie produz uma fucana diferente, a reação acrossômica só ocorre em espermatozoides da mesma espécie, diminuindo assim as chances da fertilização interespecífica (Alves *et al*, 1997).

Diversos estudos têm abordado as propriedades biológicas das fucanas em sistemas mamíferos, mostrando que elas podem ter atividades anticoagulante, antiadesiva, anti-inflamatória e antimetastática, de acordo com a sua estrutura (Tang *et al*, 2006; Pomin & Mourão, 2008). Embora as fucanas extraídas de algas possuam potentes ações farmacológicas, a heterogeneidade e complexidade estruturais não permitem um total entendimento das suas propriedades bioquímicas e com isso é difícil estabelecer uma relação entre a estrutura química e a função biológica desses compostos. Por outro lado, fucanas

extraídas de invertebrados marinhos têm suas estruturas bem caracterizadas, o que torna mais fácil o entendimento das suas atividades biológicas. Assim, estas fucanas têm sido preferencialmente escolhidas para estudos farmacológicos que visam o desenvolvimento de novas drogas (Pomin, 2009).

Nosso grupo vem colaborando com o grupo do professor Paulo Mourão do Instituto de Bioquímica Médica na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, que possui estudos que investigam a atividade anti-coagulante e anti-trombótica de fucanas extraídas de invertebrados marinhos. Nossa colaboração visa estudar a influência de polissacarídeos com baixa atividade anti-coagulante na biologia tumoral (Esquema 2). As fucanas cedidas pelo prof. Paulo Mourão são extraídas do gel do óvulo das seguintes espécies de ouriço-do-mar: *Lytechinus variegatus*, *Strongylocentrotus franciscanus*, *Strongylocentrotus pallidus*, *Arbacia lixula* e *Strongylocentrotus droebachiensis* (Figura 7).

Como já mencionado, a heparina possui atividades anti-tumorais e devido a sua potente ação anti-coagulante, o risco de hemorragias restringe seu uso na clínica. Durante o desenvolvimento deste trabalho, iremos comparar o efeito das fucanas com o efeito da heparina na atividade anti-tumoral. Assim, se as fucanas apresentarem melhores respostas, podem ser boas candidatas para alternativas ao uso da heparina.

Origem do polissacarídeo	APTT (IU/mg)
<i>L. variegatus</i>	8
<i>S. franciscanus</i>	≈2
<i>S. pallidus</i>	18
<i>S. droebachiensis</i>	<1
<i>A. lixula</i>	<1
Heparina	193

Quadro 1. Potencial anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados determinado pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). (modificado de Pereira *et al* 1999, Pereira *et al* 2002 e Pomin, 2009).

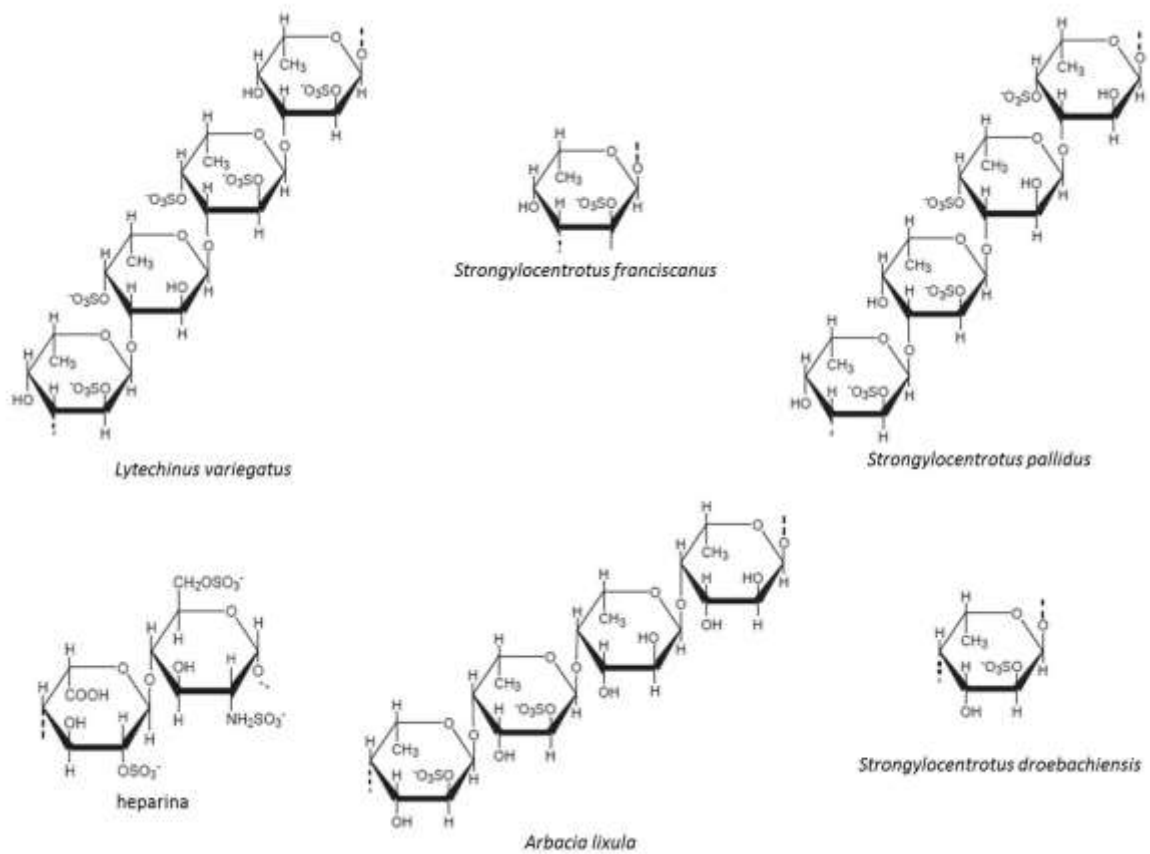


Figura 7. Unidades de repetição das fucanas sulfatadas e da heparina (modificado de Berteau & Mulloy, 2003).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Em virtude do que foi relatado anteriormente mostrando a importância dos polissacarídeos sulfatados na biologia tumoral temos como objetivo geral avaliar, através de ensaios *in vitro*, o efeito de fucanas extraídas de diferentes espécies de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*, *Strongylocentrotus franciscanus*, *Strongylocentrotus pallidus*, *Arbacia lixula* e *Strongylocentrotus droebachiensis*) na modulação de diferentes etapas da progressão tumoral (adesão, migração, proliferação e viabilidade celular), utilizando como modelo linhagens de células de tumor de próstata. Pretendemos ainda esclarecer alguns mecanismos celulares envolvidos nesses eventos.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel das diferentes fucanas sulfatadas na adesão das células tumorais de próstata às células endoteliais e à matriz subendotelial.
- Estudar o efeito das fucanas sulfatadas na migração transendotelial das células tumorais de próstata.
- Investigar o papel das fucanas sulfatadas na proliferação e na viabilidade das células tumorais de próstata.
- Avaliar a possível interação das fucanas sulfatadas com fatores de crescimento e a modulação de vias de sinalização intracelular induzidas por estes fatores.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Linhagens tumorais

Foram utilizadas as linhagens tumorais de próstata humana andrógenos-independentes, PC-3 – proveniente de metástase óssea - e DU-145 – proveniente de metástase cerebral- obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection/EUA*). As células foram expandidas em frascos de cultura de 75cm², em meio RPMI (SIGMA-ALDRICH) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO), L-glutamina (2 mM), antibióticos (penicilina/estreptomicina 500 µg/mL e cipro 5 µg/mL) e fungisona (2,5 µg/mL) e mantidas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ até atingirem sub-confluência.

Para a utilização nos ensaios, as células foram descoladas dos frascos cultura utilizando-se tripsina 0,025% diluída em uma solução de NaCl 0,14 M, NaHPO₄ 9 mM, KCl 3 mM, vermelho de fenol 0,02% e EDTA 0,02% (solução Versène). As células foram incubadas com esta solução por 5 minutos a 37°C e para paralisar a reação foi acrescentado meio contendo SFB. Em seguida, as células foram centrifugadas a 180 x g e o sobrenadante foi descartado. As células ficaram incubadas em meio RPMI com 10% SFB por 1 hora para a recuperação de seus receptores de membrana. O número de células foi estabelecido por contagem em hemocitômetro e ajustado de acordo com o ensaio.

2.2 Cultura de Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVEC).

As HUVECs foram obtidas pelo tratamento de veia de cordões umbilicais humanos com a enzima collagenase e cultivadas segundo modificações da técnica descrita por Jaffe e colaboradores (Jaffe *et al*, 1973).

Os cordões umbilicais foram obtidos do Hospital-Maternidade Carmela Dutra, no Rio de Janeiro, até no máximo 24 horas após o parto e armazenados a 4°C em frascos com PBS estéril, pH 6,5, contendo glicose 0,111 M (PBS-glicose).

O procedimento para obtenção de células endoteliais da veia umbilical humana foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após assepsia externa do cordão com gaze estéril, a veia do cordão foi canulada nas duas extremidades com cânulas de metal e lavada com PBS rico em glicose a 37°C. As células foram descoladas da parede interna da veia com a adição

de collagenase tipo IV 0,1% em PBS-glicose. Os cordões foram mantidos a 37°C por 10 minutos e depois as células foram coletadas em um tubo contendo meio 199 (M199) complementado com 20% de SFB, L-glutamina 2 mM, fungisona 2,5 µg/mL e os antibióticos penicilina/streptomicina 500 µg/mL e cipro 5 µg/mL. A suspensão celular foi submetida a uma centrifugação a 180 x g durante 10 minutos para sedimentação das células, que depois foram ressuspensas em M199 com 20% de SFB.

A suspensão celular foi distribuída em garrafas de cultura de 25 cm² de área, previamente recoberta com gelatina 1% estéril. As garrafas de cultura primária foram mantidas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. O meio de cultura das garrafas foi substituído a cada dois dias por meio novo suplementado com SFB e antibióticos até que atingissem a confluência.

Para obtenção das subculturas, as culturas primárias em confluência foram incubadas por 5 minutos a 37°C com solução *Vérsène* contendo tripsina 0,025% e em seguida centrifugadas a 180 x g. O sobrenadante foi descartado e as HUVECs ressuspensas em M199 com 20% SFB e antibióticos. As células foram replaqueadas em garrafas de 75 cm² previamente recobertas com gelatina 1% estéril e cresceram em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ até atingirem confluência.

Para a utilização das células nos ensaios, após serem descoladas dos frascos de cultura com tripsina, conforme descrito acima, o número de células foi estabelecido por contagem em hemocítômetro e ajustado de acordo com o ensaio.

2.3 Polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados utilizados neste trabalho foram extraídos do gel que envolve os óvulos das seguintes espécies de ouriço do mar: *Lytechinus variegatus*, *Strongylocentrotus pallidus*, *Arbacia lixula*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Strongylocentrotus franciscanus*, segundo técnica descrita por Alves e colaboradores (Alves *et al*, 1997) no Instituto de Bioquímica Médica, pelo grupo do professor Paulo Mourão. A heparina utilizada nos ensaios foi obtida de intestino suíno e cedida pela empresa Cristália. Essa preparação foi analisada no laboratório do prof. Paulo Mourão e atende a todas as exigências das Farmacopéias Brasileira, Americana e Européia. Seu peso molecular é de aproximadamente 14 KDa.

2.4 Adesão das células tumorais à monocamada endotelial.

As subculturas de HUVECs foram retiradas da garrafa com tripsina, como descrito anteriormente, e plaqueadas em placas de 24 poços previamente tratadas com gelatina 1% (1×10^5 células/cm²) em M199 complementado com 20% SFB, L-glutamina, antibióticos e crescidas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ por 48h. Os poços foram lavados 3 vezes com M199 e a monocamada endotelial foi incubada por 4 horas com TNF- α (1ng/mL) em M199 contendo 0,1% BSA (SIGMA-ALDRICH). Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com M199 e incubados com os polissacarídeos diluídos em meio RPMI com 0,1% BSA por 30 minutos (1, 10, 100 μ g/mL).

As células tumorais com suas membranas previamente marcadas com o fluorocromo vermelho (PKH 26/SIGMA-ALDRICH), de acordo com as instruções do fornecedor, foram plaqueadas sobre a monocamada endotelial ($0,15 \times 10^5$ células/cm²) em meio RPMI contendo 0,1% BSA. A interação ocorreu por 45 minutos em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com meio RPMI para retirar as células tumorais que não estavam aderidas à monocamada e os poços foram incubados por 10 minutos com paraformaldeído 3,7%, diluído em PBS para a fixação das células. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS e as células visualizadas em microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71). A quantificação das células tumorais aderidas ocorreu pela contagem de 10 campos aleatórios em um aumento de 400 vezes. Todas as condições foram feitas em triplicata.

2.5 Adesão das células tumorais em matriz subendotelial.

As HUVECs foram plaqueadas em placa de 96 poços previamente tratados com gelatina 1% ($1,8 \times 10^5$ células/cm²) em M199 complementado com 20% SFB, L-glutamina e antibióticos e crescidas por 48h em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂.

Os poços foram lavados 3x com M199 e as células lisadas com PBS contendo CaCl₂ 0,001M (PBS-Ca²⁺), Triton X-100 0,1%, NH₄OH 0,1 M e inibidores de protease (PMSF 1 mM e leupeptina 40 μ M) a 4°C. Os restos celulares foram eliminados por sucessivas lavagens delicadas com PBS gelado. A rede proteica restante, invisível ao microscópio óptico, é o que chamaremos de matriz imobilizada livre de células, na qual é possível detectar elementos da matriz extracelular por técnicas imunocitoquímicas. A matriz subendotelial foi incubada com

1% de BSA em PBS- Ca^{+2} a 37°C por 2 horas para o bloqueio de eventuais interações inespecíficas em regiões que não tenham sido recobertas por matriz subendotelial, diminuindo assim a possibilidade das células tumorais aderirem em outras regiões que não aquelas cobertas pelas proteínas da matriz. Depois do bloqueio, as matrizes foram lavadas 3 vezes com M199 e incubadas com os polissacarídeos (1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI contendo 0,1% BSA por 30 minutos a 37°C. As células tumorais foram descoladas com tripsina diluída em *Verséne* e plaqueadas ($0,9 \times 10^5$ células/ cm^2) sobre a matriz subendotelial. A interação ocorreu por 1 hora em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO_2 . A quantificação das células aderidas foi baseada no método do MTT, no qual a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, resulta na produção de cristais de formazano, intensamente coloridos no interior das células. Estes podem ser dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o isopropanol, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com meio RPMI para a retirada de células que não estavam aderidas à matriz e incubados com 1mg/mL MTT diluído em meio de cultura por 2 horas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO_2 . O sobrenadante foi retirado e os poços incubados com 100 μL de isopropanol para a lise das células e a solubilização dos cristais de MTT. A absorvância do extrato foi lida a 595 nm no espectrofotômetro (Multiskan Spectrum/Thermo Scientific). A quantificação das células foi feita com base em uma curva padrão obtida com as células tumorais e que receberam o mesmo tratamento com MTT como descrito acima.

2.6 Migração transendotelial das células tumorais.

As HUVECs ($1,8 \times 10^5$ células/ cm^2) foram plaqueadas em insertos de policarbonato contendo poros de 8 μm (BD Biosciences) tratados com gelatina 1% em M199 com 20% SFB. Os insertos foram colocados em placa de 24 poços contendo M199 contendo 0,1% BSA, delimitando assim duas regiões do sistema: uma luminal (superior) e uma abluminal (inferior) (Figura 8). As células cresceram em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO_2 por 48 horas. Após esse tempo, as HUVECs foram lavadas 3 vezes com M199 e incubadas por 4 horas com TNF- α (1ng/mL) em M199 com 0,1% BSA. Os insertos foram lavados 3 vezes com M199 e incubados com os polissacarídeos (100 $\mu\text{g/mL}$) em meio RPMI contendo 0,1% BSA, em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO_2 por 30 minutos (a região abluminal do sistema foi

completada com 800µl de meio RPMI com 5% SFB). As células tumorais com suas membranas previamente marcadas com o fluorocromo vermelho (PKH 26/SIGMA-ALDRICH), de acordo com as instruções do fornecedor, foram plaqueadas sobre a monocamada endotelial ($0,9 \times 10^5$ células/cm²) em meio RPMI contendo 0,1% BSA. A interação ocorreu por 16 horas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. Após o tempo de incubação, as células que não transmigraram foram retiradas do lado superior da membrana com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. Os insertos foram lavados e incubados por 10 minutos com paraformaldeído 3,7%, diluído em PBS para a fixação das células. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS e as células visualizadas em microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71). A quantificação das células tumorais que transmigraram ocorreu pela contagem de 10 campos aleatórios em um aumento de 400 vezes. Todas as condições foram feitas em triplicata.

2.7 Ensaios de proliferação celular.

As células tumorais foram plaqueadas em placa de 96 poços ($0,3 \times 10^5$ células/cm²) em meio RPMI com 10% SFB e aderiram por 2 horas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. Os poços foram lavados 3 vezes com meio RPMI e incubados com os polissacarídeos (100 µg/mL) em meio RPMI contendo 5% SFB ou VEGF 10 ng/mL, em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ por diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). Alguns poços foram incubados com MTT (1mg/mL) para quantificar o número de células aderidas em 2 horas. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados 3 vezes com meio RPMI e incubados com MTT diluído em RPMI (1mg/mL) por 2 horas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. O sobrenadante foi retirado e os poços incubados com 100µL de isopropanol absoluto para a lise das células e a solubilização dos cristais de MTT. A absorvância do extrato foi lida a 595 nm no espectrofotômetro (Multiskan Spectrum/Thermo Scientific). A quantificação das células foi feita com base em uma curva padrão obtida com as células tumorais que receberam o mesmo tratamento com MTT como descrito acima.

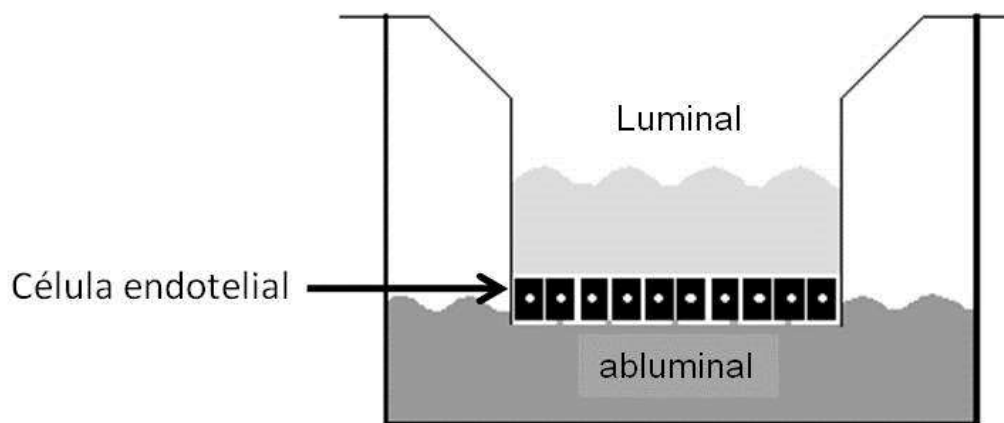


Figura 8. Sistema de migração *transwell*.

2.8 Avaliação da viabilidade de células tumorais.

Para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos dos polissacarídeos nas células tumorais, foi realizado o ensaio de marcação com Anexina V e Iodeto de propídeo (PI). As células tumorais foram plaqueadas em placa de 6 poços (1×10^5 células/cm²) em meio RPMI com 20% de SFB e aderiram por 2 h em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. Os poços foram lavados 1 vez com meio RPMI e incubados com os polissacarídeos (100 µg/mL) por 48h em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. Após esse tempo, o sobrenadante foi recolhido e para que as células descolassem do substrato, os poços foram incubados com acutase (Accutase Solution / SIGMA), por 10 minutos. As células em suspensão foram adicionadas ao sobrenadante recolhido anteriormente e centrifugadas por 10 minutos a 180 x g. O sobrenadante foi descartado e as células tratadas com o KIT de marcação com anexina V e PI de acordo com as instruções do fabricante (Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit II/ BD Pharmingen™). A leitura das células e análise das marcações foram feitas por citometria de fluxo (BD Accuri® C6 Flow Cytometer).

2.9 Avaliação da ligação dos polissacarídeos sulfatados ao VEGF.

Os polissacarídeos sulfatados (100 µg/mL; 100 µL/poço) foram incubados em placas de ELISA de 96 poços por 24 horas a 4°C. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com 1% de BSA (300 µL/poço) em PBS por 24 horas a 4°C para bloquear regiões que não estivessem recobertas com os polissacarídeos. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween®20 (PBS/Tween) e incubados com diferentes concentrações de VEGF (Recombinant Human VEGF/PeproTech, Ribeirão Preto, SP) diluído em PBS (100 µL/poço) por 24 horas a 4°C. Foi realizado um ensaio de ELISA indireto para avaliar a ligação do VEGF com os polissacarídeos. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS/Tween e incubados com anticorpo primário anti-VEGF₁₆₅ (R&D; 2µg/mL) diluído em PBS/Tween por 2h a 37°C. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS/Tween e incubados com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Mouse-HRP – DAKO ; diluição 1:2000) por 1 hora. Após a lavagem com PBS/Tween, os poços foram incubados com 100 µl do reagente O-fenilenediamino (OPD) (0,5 mg/mL), diluído em tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 4,5 contendo 0,05% de H₂O₂. A reação colorimétrica foi paralisada com H₂SO₄ 3 M e lida em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum/Thermo Scientific) a 490nm.

2.10 Detecção VEGF no meio condicionado de células tumorais.

As células tumorais foram plaqueadas em placa de 24 poços (1x 10⁵ células/cm²) em meio RPMI sem complementos. Após diferentes tempos, o meio de cultivo das células foi recolhido dos poços (meio condicionado), centrifugado por 10 minutos a 180 x g (miniSpin/eppendorf) para o descarte de eventuais resíduos celulares e o sobrenadante recolhido. Para a detecção do VEGF foi utilizado o Kit de ELISA para VEGF (Human VEGF ELISA Development Kit/PeproTech). De acordo com as instruções do fabricante, a placa de Elisa foi sensibilizada com o anticorpo de captura (0,5 µg/mL) *overnight* a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS/ Tween, os poços foram incubados com BSA 1% para bloquear regiões que não estivessem recobertas com o anticorpo de captura, evitando assim ligações inespecíficas entre os reagentes. Após o bloqueio, os poços foram incubados com o meio condicionado das células tumorais (100 µL/poço) por duas horas, em temperatura ambiente. Alguns poços foram incubados com VEGF recombinante humano em diferentes

concentrações, para estabelecer uma curva padrão de VEGF. Os poços foram lavados com PBS /Tween e incubados com o anticorpo de detecção (0,25 µg/mL) por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados com PBS /Tween e incubados com avidina-peroxidase por 30 minutos. Após lavagem como descrito acima, os poços foram incubados com 100 µL do reagente O-fenilenediamino (OPD) (0,5 mg/mL), diluído em tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 4,5 contendo 0,05% de H₂O₂. A reação colorimétrica foi paralisada com H₂SO₄ 3M e lida em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum/Thermo Scientific) a 490 nm.

2.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS (PAGE-SDS)

As células tumorais foram plaqueadas em placas de 6 poços (0,6x10⁵ células/cm²) diluídas em meio RPMI com 10% SFB e aderiram por 2 horas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. Os poços foram lavados 3 vezes com meio RPMI para a retirada das células que não aderiram e incubados com os polissacarídeos (100 µg/mL) em meio RPMI contendo 5% SFB em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. Após 48 horas, os poços foram lavados com meio RPMI e incubados com tampão de lise (TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, Triton-X 100 1%) e inibidores de protease (PMSF 1 mM e Leupeptina 40 µM) por 5 minutos a 4°C. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante diluído em tampão de amostra (TRIS 25 mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, pH 6,8). As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos. Para a análise do padrão de ativação de determinadas proteínas nas células tumorais, foi realizada uma eletroforese em sistema de mini gel vertical da Biorad. O gel fracionador foi preparado com um gradiente de concentração de 12% de acrilamida e o gel espaçador com um gradiente de concentração de 3% de acrilamida. O gel foi colocado em uma cuba com tampão TRIS 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1% e as amostras foram aplicadas ao gel no volume de 25 µl/poço. Foi utilizado um padrão de peso molecular na faixa de 12 Kda a 225 Kda. A eletroforese foi desenvolvida na voltagem de 100 V.

2.12 Western Blotting

Os componentes separados por peso molecular foram transferidos para uma membrana de PVDF. Esta membrana foi previamente tratada com metanol, água destilada e tampão de transferência (TRIS 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20%). A membrana foi montada sobre o gel em um sistema de transferência Trans-Blot para mini-gel da Biorad. O sistema foi colocado em uma cuba com tampão de transferência e a transferência ocorreu por 90 minutos com voltagem de 100 V sob refrigeração. Após esse tempo, a membrana foi bloqueada *overnight* com BSA 5% em tampão TBS, a 4°C. Cada membrana foi incubada *overnight* a 4°C com os anticorpos (Cell Signaling) contra as respectivas proteínas de interesse, AKT, P-AKT (ser 473), ERK ou P-ERK (Thr202/Tyr204), todos os anticorpos foram utilizados na diluição 1:1000. A membrana passou por sucessivas lavagens com TBS contendo 0,05% de Tween®20 e foi incubada com os anticorpos secundários conjugados a HRP (Rabbit-HRP – DAKO; diluição 1:2000) por 1 hora. Após esse tempo, a membranas foram novamente lavadas com TBS contendo 0,05% de Tween®20. Em seguida, a membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (Amersham ECL Western Blotting detection reagents) por quimioluminiscência de acordo com as instruções do fabricante. A membrana foi transferida para um envelope plástico e inserida em um cassete. O filme foi colocado no cassete e exposto à membrana em câmara escura por tempos variáveis e mergulhado no revelador, água e fixador, respectivamente. Em seguida, o filme foi lavado em água corrente e colocado para secar. O filme foi digitalizado e a densidade das bandas reveladas foi quantificada por análise no programa Adobe-Photoshop 6.0.

2.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas no programa Excel (Microsoft 2010) pelo teste *t de student*, para comparar os resultados obtidos nas condições controle e nas condições tratadas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Fucanas sulfatadas inibem a adesão das células tumorais ao endotélio.

A interação das células tumorais com o endotélio durante o processo de metástase é mediada pela ligação de carboidratos expressos na superfície das células tumorais com selectinas expressas nas células endoteliais (Kannagi, 1997). Polissacarídeos sulfatados podem modular esta interação através da ligação com as selectinas e/ou com os ligantes de selectinas, inibindo assim a ligação das células tumorais ao endotélio (Borsig *et al*, 2007).

Neste ensaio, tivemos como objetivo avaliar o efeito das fucanas sulfatadas na adesão das linhagens tumorais DU-145 e PC-3 à monocamada endotelial. Como a expressão de selectinas pelo endotélio depende do estímulo de citocinas pró-inflamatórias, a monocamada endotelial foi ativada com TNF- α (1ng/mL) por 4 horas, para garantir que tanto as selectinas de expressão rápida, como a P-selectina e tardia, como a E-selectina, estariam expressas no endotélio. As células endoteliais ativadas foram incubadas por 30 minutos com os polissacarídeos e as células tumorais marcadas com fluorocromo vermelho foram então plaquedas sobre o endotélio. Após 45 minutos, os poços foram lavados e as células fixadas para contagem em microscópio de fluorescência.

Inicialmente testamos a fucana extraída de *L.variegatus*, FucSulf I. A Figura 9 representa um ensaio de adesão mostrando o efeito de diferentes concentrações da FucSulf I (1, 10 e 100 μ g/mL) na inibição da adesão das linhagens DU-145 (Figura 9A) e PC-3 (Figura 9B) à monocamada endotelial. O gráfico mostra a porcentagem de células aderidas à monocamada em relação ao controle (adesão na ausência da FucSulf I), onde consideramos a média do número de células contadas em 10 campos aleatórios como 100%. Nas duas linhagens de células tumorais testadas, a inibição da adesão das células tumorais pela FucSulf I foi significativa na concentração de 10 μ g/mL, sendo observado um maior percentual de inibição na concentração de 100 μ g/mL. Entretanto, a FucSulf I exerceu um efeito inibitório mais efetivo na linhagem DU-145, visto que na concentração de 100 μ g/mL a inibição da adesão desta linhagem ao endotélio foi de aproximadamente 45% quando comparado ao percentual de inibição da linhagem PC-3, que foi de aproximadamente 25%, na mesma concentração de FucSulf I.

Em seguida nós comparamos o potencial inibitório da FucSulf I (100 μ g/mL) ao de outras fucanas. Além disso, nós também avaliamos a adesão de células tumorais ao endotélio

na presença de heparina, uma vez que ela é um polissacarídeo sulfatado com atividades anti-tumorais já descritas na literatura. Todas as fucanas testadas reduziram significativamente a adesão da linhagem DU-145 ao endotélio (Figura 10A). Entretanto, as fucanas extraídas de *L. variegatus* (FucSulf I) e *S. franciscanus* foram as mais potentes, uma vez que inibiram a adesão em aproximadamente 45%. Além disso, as fucanas extraídas de *L. variegatus* (FucSulf I) e *S. franciscanus* foram as únicas que inibiram a adesão da linhagem PC-3 ao endotélio (Figura 10B), atingindo um percentual de inibição de aproximadamente 20% e 25%, respectivamente. Nós também observamos que a heparina não inibiu a adesão de nenhuma das linhagens utilizadas. Estes dados sugerem que a FucSulf I pode estar interferindo na ligação entre os carboidratos presentes na superfície das células tumorais com as selectinas expressas nas células endoteliais e que devido à diferença entre o potencial inibitório da FucSulf I nas duas linhagens, a composição de carboidratos de cada tipo celular deve ser diferente.

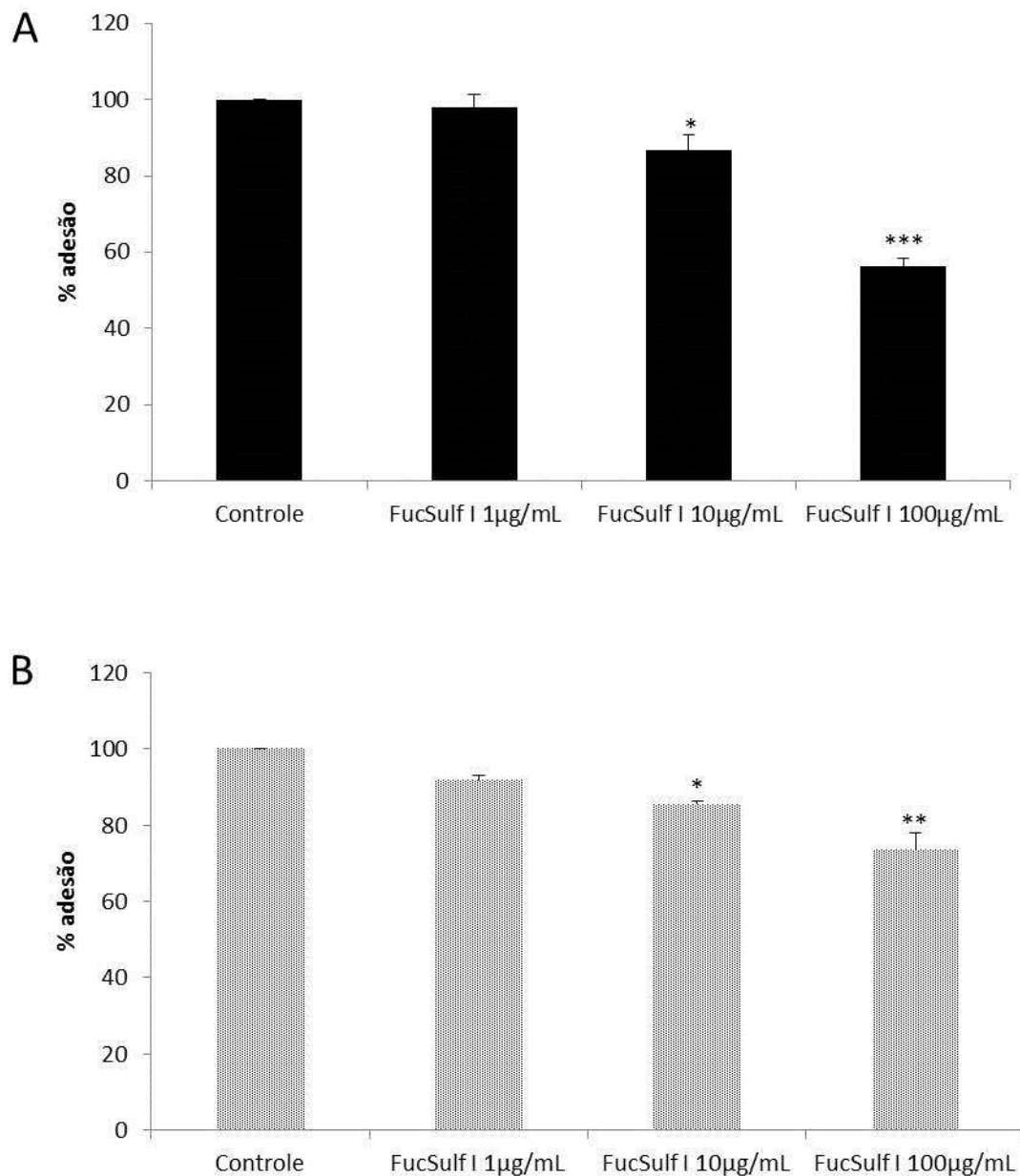


Figura 9. Inibição da adesão das células tumorais à monocamada endotelial em função de diferentes concentrações da fucana FucSulf I. As células endoteliais foram crescidas em placa de 24 poços. Após a ativação com $\text{TNF-}\alpha$, a monocamada foi lavada e incubada por 30 minutos com A FucSulf I (1, 10, 100µg/mL). As células tumorais DU-145 (A) ou PC-3 (B) marcadas com fluorocromo vermelho foram plaqueadas ($0,15 \times 10^5$ células/cm²) sobre a monocamada e a interação ocorreu por 45 minutos. Os poços foram lavados e as células aderentes fixadas com paraformaldeído 3,7%. A quantificação foi realizada por contagem de 10 campos aleatórios em cada poço em microscópio de fluorescência invertido. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

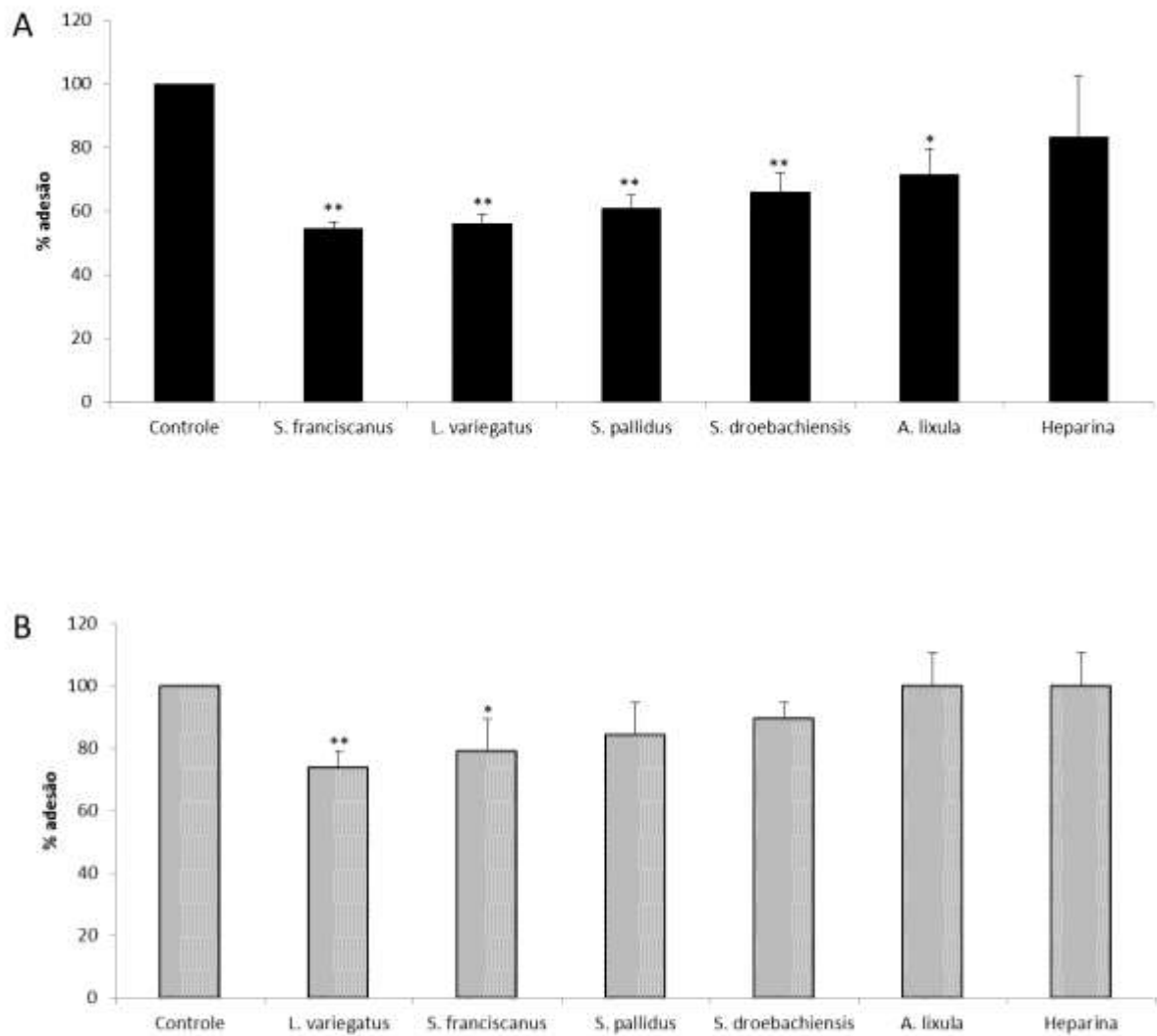


Figura 10. *Inibição da adesão das células tumorais à monocamda endotelial na presença de polissacarídeos sulfatados.* As células endoteliais foram crescidas em placa de 24 poços. Após a ativação com $\text{TNF-}\alpha$, a monocamada foi lavada e incubada por 30 minutos com os polissacarídeos ($100\mu\text{g/mL}$). As células tumorais DU-145 (A) ou PC-3 (B) marcadas com fluorocromo vermelho foram plaqueadas ($0,15 \times 10^5$ células/ cm^2) sobre a monocamada e a interação ocorreu por 45 minutos. Os poços foram lavados e as células aderentes fixadas com paraformaldeído 3,7%. A quantificação foi realizada por contagem de 10 campos aleatórios em cada poço em microscópio de fluorescência invertido. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

3.2 FucSulf I inibe a adesão da linhagem tumoral DU-145 à matriz subendotelial.

A interação das células tumorais com as moléculas de adesão expressas no endotélio leva ao ancoramento destas células na parede vascular. As células tumorais podem induzir a retração das células endoteliais e a exposição da matriz extracelular subendotelial, antes de extravasar para o interstício (Honn *et al*, 1994).

Neste ensaio, plaqueamos as células tumorais sobre a matriz subendotelial na presença dos polissacarídeos para avaliar se as fucanas sulfatadas interferem na interação entre as células tumorais e a matriz subendotelial.

Nós observamos que a fucana extraída de *L. variegatus* (FucSulf I) foi a única que inibiu significativamente (25%) a adesão da linhagem DU-145 à matriz subendotelial (Figura 11). Nenhuma fucana testada inibiu a adesão da linhagem PC-3 à matriz subendotelial (resultados não mostrados).

A FucSulf I foi uma das fucanas que mais apresentou efeito inibitório na adesão das células tumorais ao endotélio e a única que inibiu a adesão destas células à matriz subendotelial. Sendo assim, escolhemos esta fucana para dar continuidade ao estudo e iremos comparar seu efeito ao da heparina.

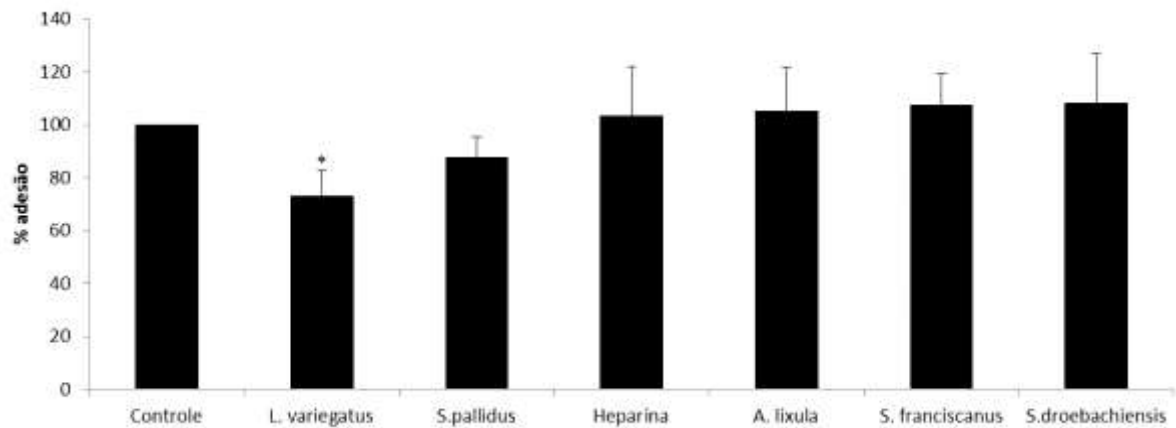


Figura 11. *Inibição da adesão das células tumorais DU-145 à matriz subendotelial na presença da fucana sulfatada extraída de L. variegatus (FucSulf I)* Monocamadas confluentes de HUVECs crescidas em placas de 96 poços foram lisadas com tampão amoníaco para a obtenção da matriz subendotelial. Após o bloqueio com BSA 0,1%, a matriz subendotelial foi incubada por 30 minutos com os polissacarídeos e as células tumorais DU-145 foram plaqueadas sobre a matriz ($0,9 \times 10^5$ células/cm²). A interação ocorreu por 1 hora, os poços foram lavados e incubados com MTT (1mg/mL) por 2 horas. A solução de MTT foi retirada dos poços e os cristais formados foram solubilizados com isopropanol absoluto. Após a leitura da placa em espectrofotômetro (595nm), a quantificação das células aderidas foi feita através da relação das absorbâncias obtidas em cada condição com as absorvâncias obtidas na curva padrão. * $p \leq 0,05$.

3.3 FucSulf I inibe a migração transendotelial das células tumorais.

Após o ancoramento ao endotélio, as células tumorais devem deixar a circulação e o extravasamento para os tecidos adjacentes ocorre pelo processo de migração transendotelial. As células tumorais podem passar por entre as células endoteliais ou, com a retração do endotélio e a exposição da matriz extracelular, as células degradam a rede de proteínas e glicosaminoglicanos e migram por através dela (Strell & Entschladen, 2008; Miles *et al*, 2007).

Avaliamos o efeito da FucSulf I e da heparina na migração transendotelial das linhagens tumorais DU-145 e PC-3 na presença de SFB como quimiotático. Após 16 horas de interação, podemos observar na Figura 12 que as condições tratadas com FucSulf I ou com heparina, apresentavam uma redução significativa de células transmigradas em relação ao controle não tratado, tanto na migração transendotelial da linhagem DU-145 (Figura 12A), quanto da linhagem PC-3 (Figura. 12B). Entretanto, mais uma vez podemos observar diferenças entre as duas linhagens celulares estudadas. Apesar de termos observado uma inibição de aproximadamente 50% na taxa de migração transendotelial na presença de FucSulf I em ambas as linhagens, o mesmo não foi observado ao utilizarmos a heparina. Neste caso, a inibição foi mais efetiva (50%) na linhagem DU-145 em comparação com a linhagem PC-3 (25%).

Como a FucSulf I inibe a adesão das células tumorais à monocamada, já esperávamos o mesmo efeito neste ensaio. Entretanto, a inibição da transmigração foi superior, chegando a 50% nas duas linhagens, enquanto a inibição da adesão foi de 45% na DU-145 e de 25% na PC-3. Além disso, a heparina, que não apresentou potencial inibitório da adesão, neste ensaio, diminuiu a porcentagem de transmigração. Assim, outros mecanismos devem estar envolvidos neste efeito observado.

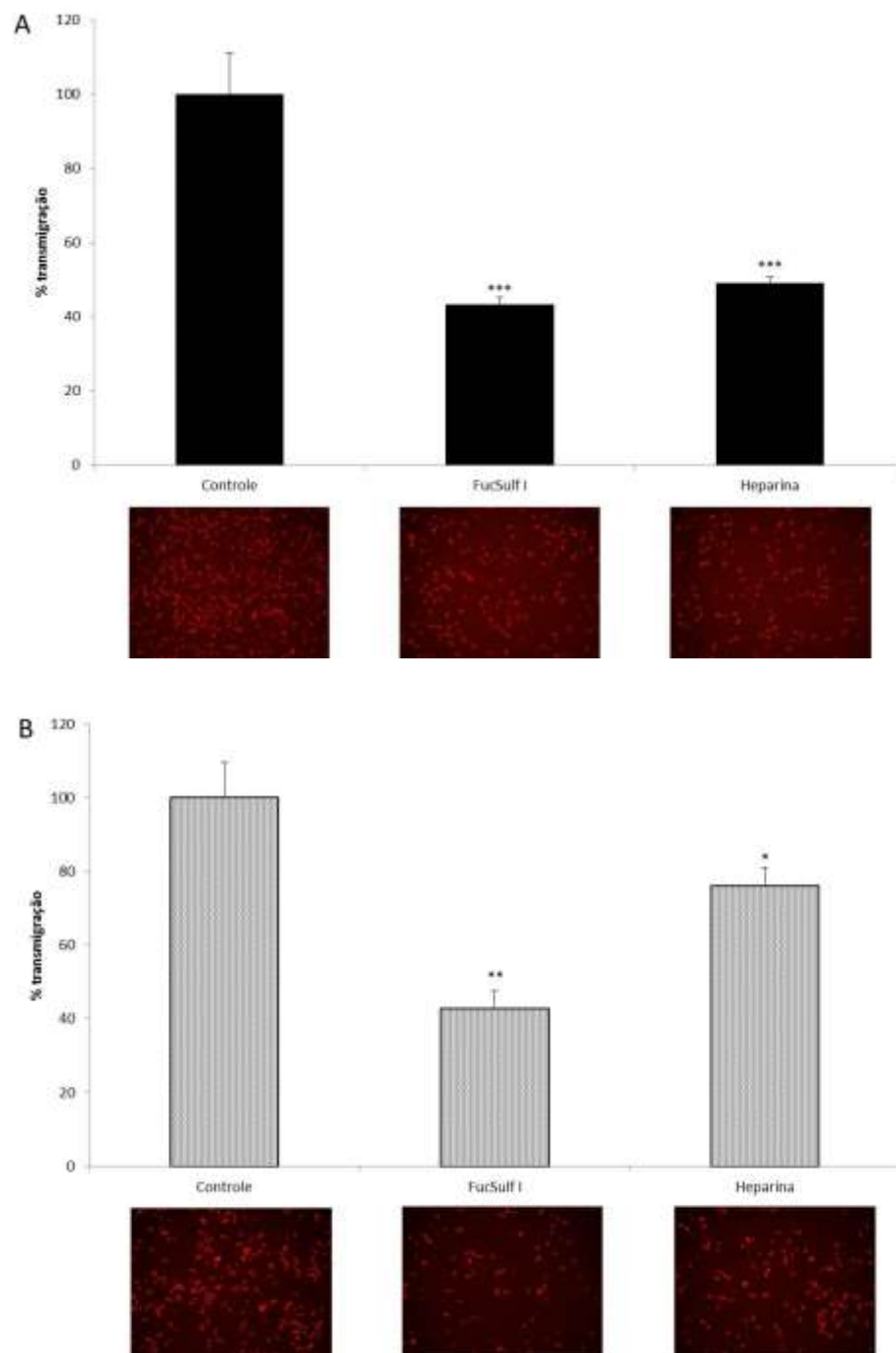


Figura 12. Inibição da migração transendotelial das linhagens DU-145 e PC-3 na presença da fucana FucSulf I. HUVECs foram crescidas em insertos de policarbonato contendo poros de 8 μ m. A monocamada endotelial foi ativada por 4 horas com TNF- α (1ng/mL) e depois incubada por 30 minutos com os polissacarídeos (100 μ g/mL). As células tumorais DU-145 (A) e PC-3 (B) previamente marcadas com o fluorocromo vermelho foram plaqueadas sobre a monocamada endotelial. Após 16 horas de interação, as células do lado superior da membrana foram retiradas com o auxílio de uma haste de algodão e as células que transmigraram fixadas com paraformaldeído 3,7%. A quantificação das células que transmigraram foi realizada por contagem de 10 campos aleatórios em cada inserto, em microscópio de fluorescência invertido. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

3.4 As linhagens tumorais DU-145 e PC-3 secretam VEGF e a FucSulf I se liga ao VEGF.

O VEGF induz um aumento na permeabilidade vascular, facilitando a passagem de células tumorais através do vaso. (Esser *et al*, 1998). O ensaio de migração transendotelial ocorre em um período de tempo relativamente longo, em que as células tumorais podem secretar fatores que ficam solúveis no meio e podem influenciar as respostas da célula endotelial. Diversos estudos mostram que as células tumorais podem secretar VEGF, que é um fator de crescimento heparano-dependente. (Grunstein *et al*, 1999). Nós decidimos então avaliar se nas condições realizadas em nossos ensaios existe VEGF endógeno, sendo secretado pelas células tumorais.

Para investigar se as linhagens tumorais DU-145 e PC-3 secretam VEGF ao longo de diferentes períodos de tempo, coletamos o meio condicionado das células tumorais em 4, 8, 16, 24, 48 e 72 horas e realizamos um ensaio de Elisa quantitativo, para a detecção de VEGF no meio. Como mostrado na Figura 13, as duas linhagens testadas secretam VEGF. Entretanto, o meio condicionado da linhagem DU-145 (Figura 13A) apresenta maiores concentrações de VEGF em relação à linhagem PC-3 (Figura 13B). Assim, no tempo de 16 horas, no qual discorre os ensaios de transmigração, há VEGF endógeno sendo produzido tanto pela linhagem DU-145 (2 ng/mL) quanto pela linhagem PC-3 (1ng/mL).

Uma vez que as células tumorais secretam VEGF e que este fator pode influenciar na migração transendotelial, aumentando a permeabilidade vascular, investigamos se a FucSulf I se liga ao VEGF. Para isso, sensibilizamos uma placa de 96 poços com FucSulf I ou heparina (100µg/mL) e incubamos os poços com diferentes concentrações de VEGF. Para avaliar a presença de VEGF nos poços recobertos com polissacarídeos, foi realizado um Elisa indireto. Nós observamos que o VEGF se liga à FucSulf I com maior avidéz do que à heparina (Figura 14). Isso pode indicar que a FucSulf I e a heparina sequestram o VEGF, impedindo sua ligação com seus receptores, diminuindo a permeabilidade endotelial.

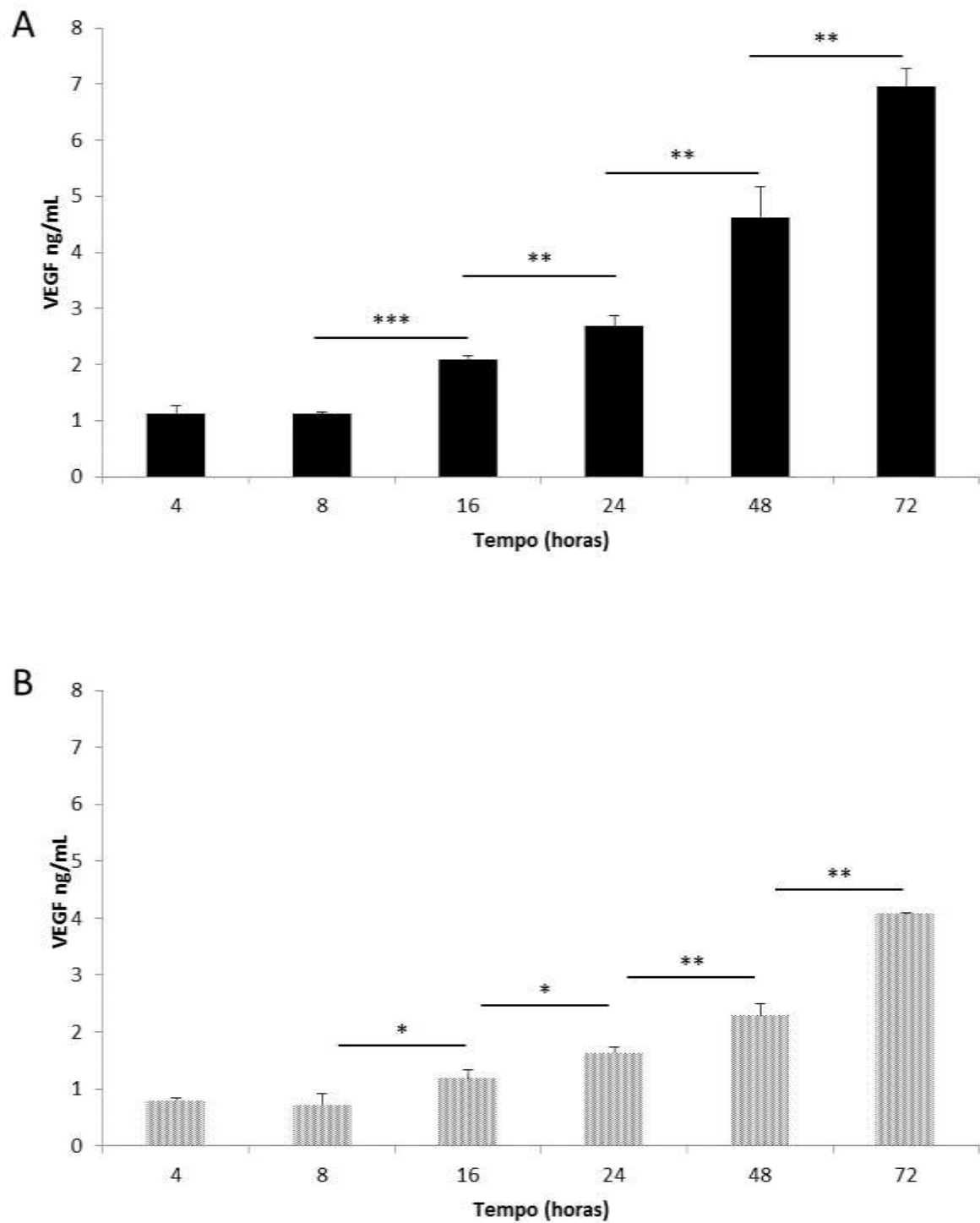


Figura 13. *Secreção de VEGF pelas linhagens tumorais DU-145 e PC-3.* Células tumorais DU-145 (A) e PC-3 (B) (1×10^5 células/cm²) foram plaqueadas em meio RPMI contendo 20% SFB. Após duas horas, os poços foram lavados e incubados com 1mL de meio RPMI sem SFB. Os meios condicionados foram recolhidos nos diferentes tempos e foi realizado um ELISA direto para a quantificação do VEGF presente nos meios. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

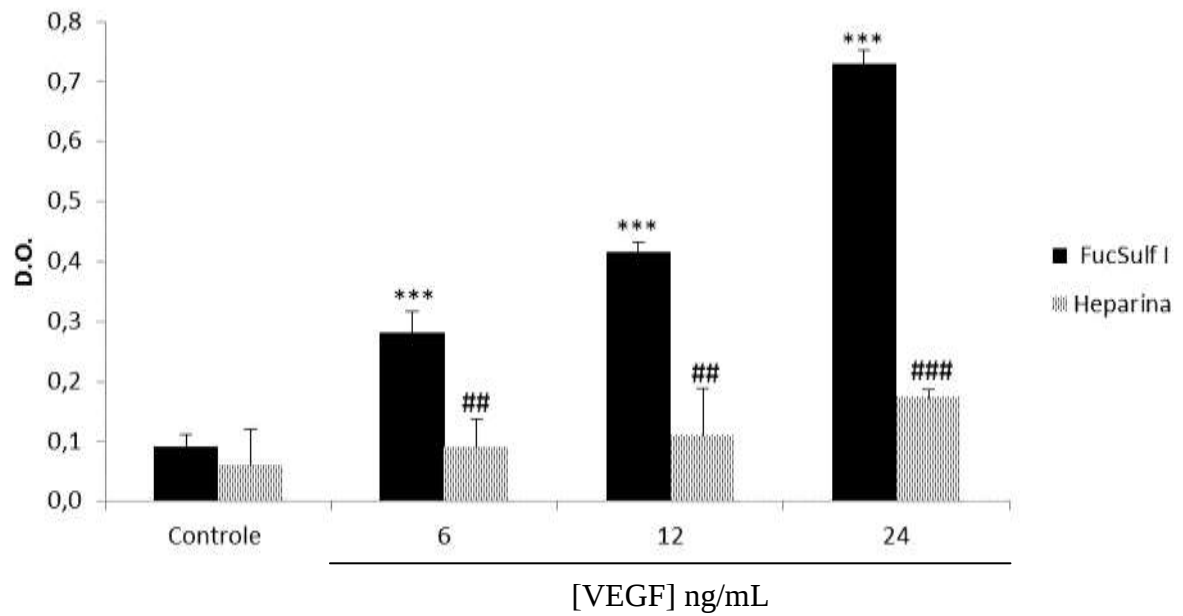


Figura 14. *FucSulf I se liga ao VEGF com maior avidéz que a heparina.* Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µg/mL de polissacarídeos *overnight* a 4°C e bloqueadas em seguida com 1% de BSA. Os poços foram então incubados com VEGF em diferentes concentrações e um ELISA indireto para a detecção do VEGF ligado aos polissacarídeos foi realizado. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, quando comparados ao controle FucSulf I. # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$, quando comparados ao controle heparina.

3.5 A FucSulf I inibe a proliferação das células tumorais e não apresenta efeitos citotóxicos.

O estabelecimento do foco tumoral em outros sítios de colonização depende da capacidade da célula tumoral de proliferar neste novo microambiente. Elas podem responder a diversos fatores de crescimento presentes no microambiente tumoral, como VEGF, FGF, EGF, entre outros, aumentando seu potencial proliferativo. Estudos mostram que polissacarídeos sulfatados podem interferir na proliferação celular modulando a ligação de fatores de crescimento heparano-dependentes aos seus receptores (Fuster & Esko, 2005).

Nesta etapa do trabalho, investigamos a modulação da proliferação das linhagens DU-145 e PC-3 pela FucSulf I ao longo de 72 horas (Figura 15). As células tumorais foram plaqueadas em placa de 96 poços. Após duas horas, o meio foi retirado e os poços incubados com os polissacarídeos diluídos em meio RPMI com 5% SFB. Ao final de cada tempo, o número de células foi quantificado pelo método MTT previamente descrito. Nós verificamos que a proliferação das linhagens DU-145 (Figura 15A) e PC-3 (Figura 15B) foi inibida significativamente pela FucSulf I a partir de 48 horas de tratamento. Entretanto o efeito da FucSulf I na proliferação foi mais potente na linhagem DU-145 mostrando uma taxa inibitória de 30% após 72h, enquanto a proliferação da PC-3 na presença desta fucana foi 20% menor no mesmo tempo, em relação ao controle. Nós verificamos ainda que a heparina não exerce efeito significativo na proliferação de ambas as linhagens, sugerindo que o mecanismo de ação destes dois tipos de polissacarídeos sulfatados (FucSulf I e heparina) seja diferente.

Para avaliar se a inibição da proliferação celular poderia ser devido a um efeito citotóxico da FucSulf I, analisamos a proporção de células tumorais viáveis na presença de FucSulf I através da marcação por Anexina V e Iodeto de Propídio. As células tumorais foram incubadas por 48 horas com a FucSulf I (100 µg/ mL) diluída em RPMI contendo de 5% de SFB e os resultados foram comparados com os dados obtidos para as células controle (células incubadas apenas com RPMI contendo 5% SFB). Nós observamos que na linhagem DU-145 (Figura 16A), o grupo controle apresentava cerca de 78% de células viáveis e o grupo incubado com a fucana, 71%. Na linhagem PC-3 (Figura 16B), tanto o grupo controle quanto o grupo tratado apresentavam aproximadamente 87% de células viáveis. Assim, não houve diferença significativa na porcentagem de células viáveis encontradas nos grupos controle e nos grupos tratados com a fucana. Estes dados corroboram a hipótese de que a FucSulf I atua inibindo algum mecanismo de controle da proliferação em células tumorais e não exerce efeito na viabilidade das linhagens testadas.

3.6 A FucSulf I inibe a proliferação tumoral na presença e na ausência de fatores de crescimento exógenos.

Os receptores de VEGF foram descritos inicialmente como receptores presentes apenas em células endoteliais. Atualmente, sabe-se que células tumorais podem expressar receptores para este fator de crescimento e a ativação dos mesmos aumenta seu potencial proliferativo e migratório (Wey *et al*, 2005).

Nós mostramos que as duas linhagens de células tumorais de próstata (DU-145 e PC-3) secretam VEGF e que este fator de crescimento é capaz de se ligar a FucSulf I. Os ensaios de proliferação realizados anteriormente eram feitos na presença de 5% de SFB. Neste ensaio nós avaliaremos o efeito da FucSulf I na proliferação das células tumorais na ausência de fatores de crescimento exógenos (RPMI puro) e compararemos os resultados com as taxas de proliferação celular obtidas na presença de VEGF.

Como demonstrado na figura 17, a FucSulf I apresentou a mesma taxa de inibição da proliferação da linhagem DU-145 na presença de VEGF e na ausência de fatores exógenos (40%) (Figura 17 A), enquanto na linhagem PC-3 a inibição foi maior na presença de VEGF (40%) do que na ausência de fatores exógenos (25%) (Figura 17B). Observamos que a linhagem DU-145 produz maiores concentrações de VEGF que a PC-3. Talvez a quantidade de VEGF secretado pela linhagem DU-145 possa ser suficiente para saturar os receptores na superfície das células tumorais, já levando a um patamar máximo de resposta esperada. Assim, mesmo na presença do VEGF exógeno, a resposta celular será a mesma. Já a linhagem PC-3 secreta menores concentrações de VEGF ao longo do tempo, o que pode favorecer a ação do VEGF exógeno nos receptores. Consequentemente, a inibição da proliferação pela FucSulf I será maior na presença de VEGF exógeno. Além disso, não podemos descartar a hipótese de que as linhagens podem produzir outros fatores de crescimento heparano-dependentes que também estariam sendo modulados pela FucSulf I.

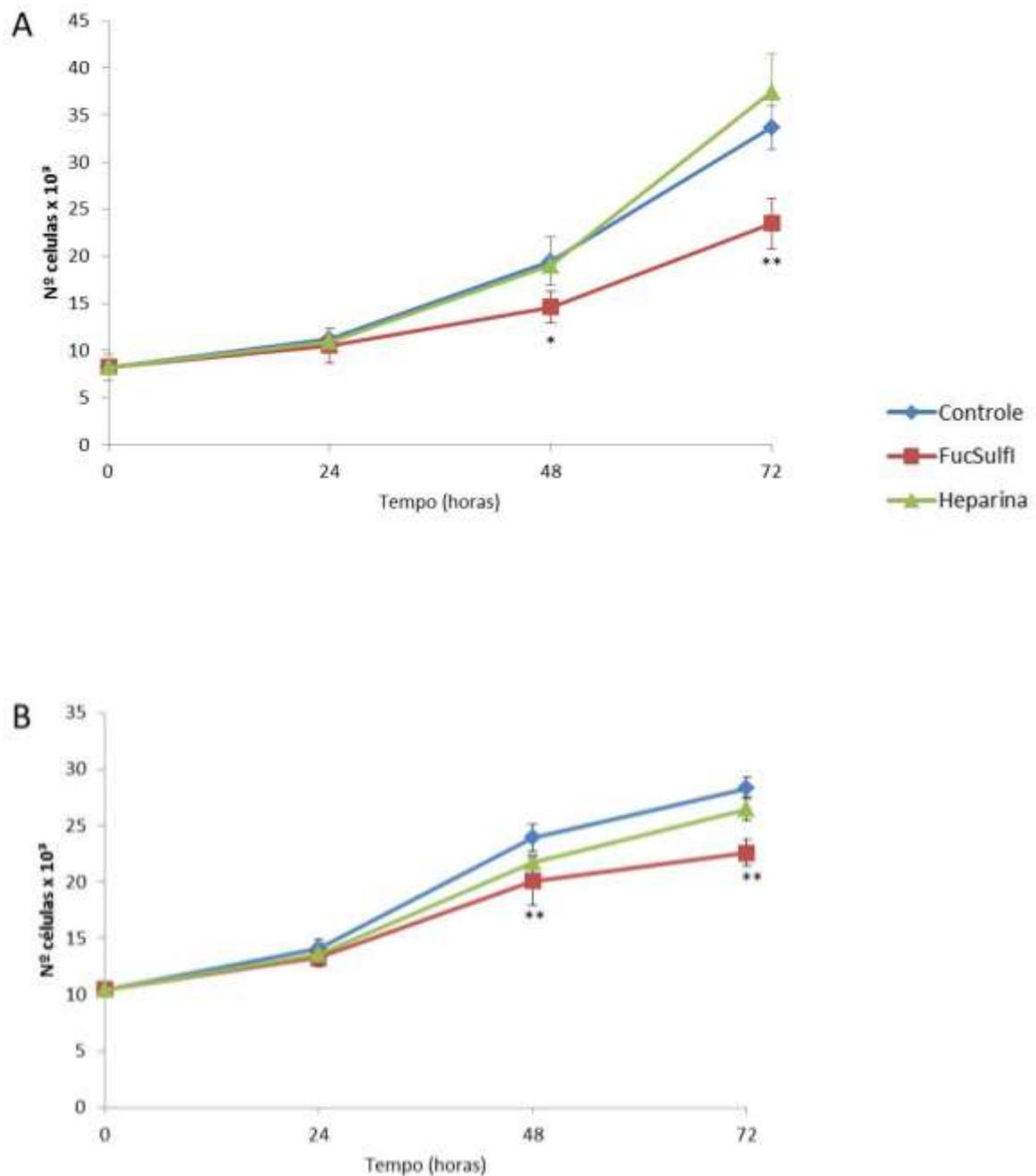


Figura 15. A *FucSulf I* inibe a proliferação celular. As linhagens tumorais DU-145 (A) e PC-3 (B) foram semeadas ($0,3 \times 10^5$ células/cm²) em placas de 96 poços. Após duas horas de adesão, o meio foi retirado e os poços incubados com os polissacarídeos diluídos em meio RPMI contendo 5% SFB (100 µg/mL). Alguns poços foram incubados com MTT (1mg/mL) para quantificar o número de células aderidas em 2 horas. O número de células de cada condição foi determinado pelo método MTT (1mg/mL) em 24, 48, 72 horas. *p≤0,05; **p≤0,01.

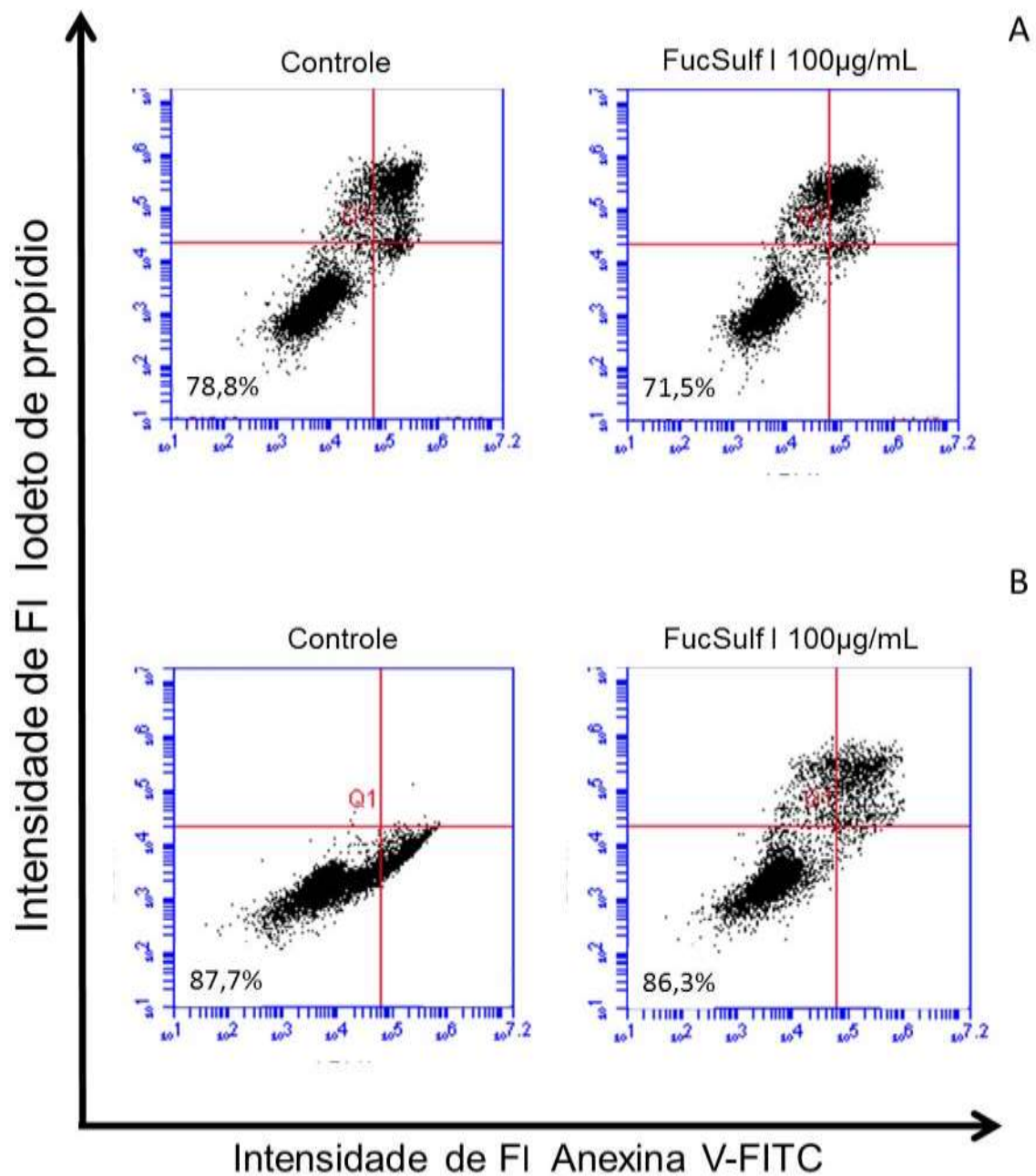


Figura 16. A *FucSulf I* não apresenta efeitos citotóxicos nas linhagens DU-145 e PC-3. As células tumorais (1×10^5 células/cm²) DU-145 (A) e PC-3 (B) foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas por 2 horas a 37°. C a 5% de CO₂. Após este período, as células foram incubadas com a *FucSulf I*, diluída em meio RPMI com 5% de SFB (100µg/mL) por 48 horas. As células foram retiradas da placa com acutase e tratadas com anexina V e iodeto de propídio e em seguida analisadas no citômetro de fluxo. Os valores percentuais dos gráficos indicam a porcentagem de células viáveis em cada condição.

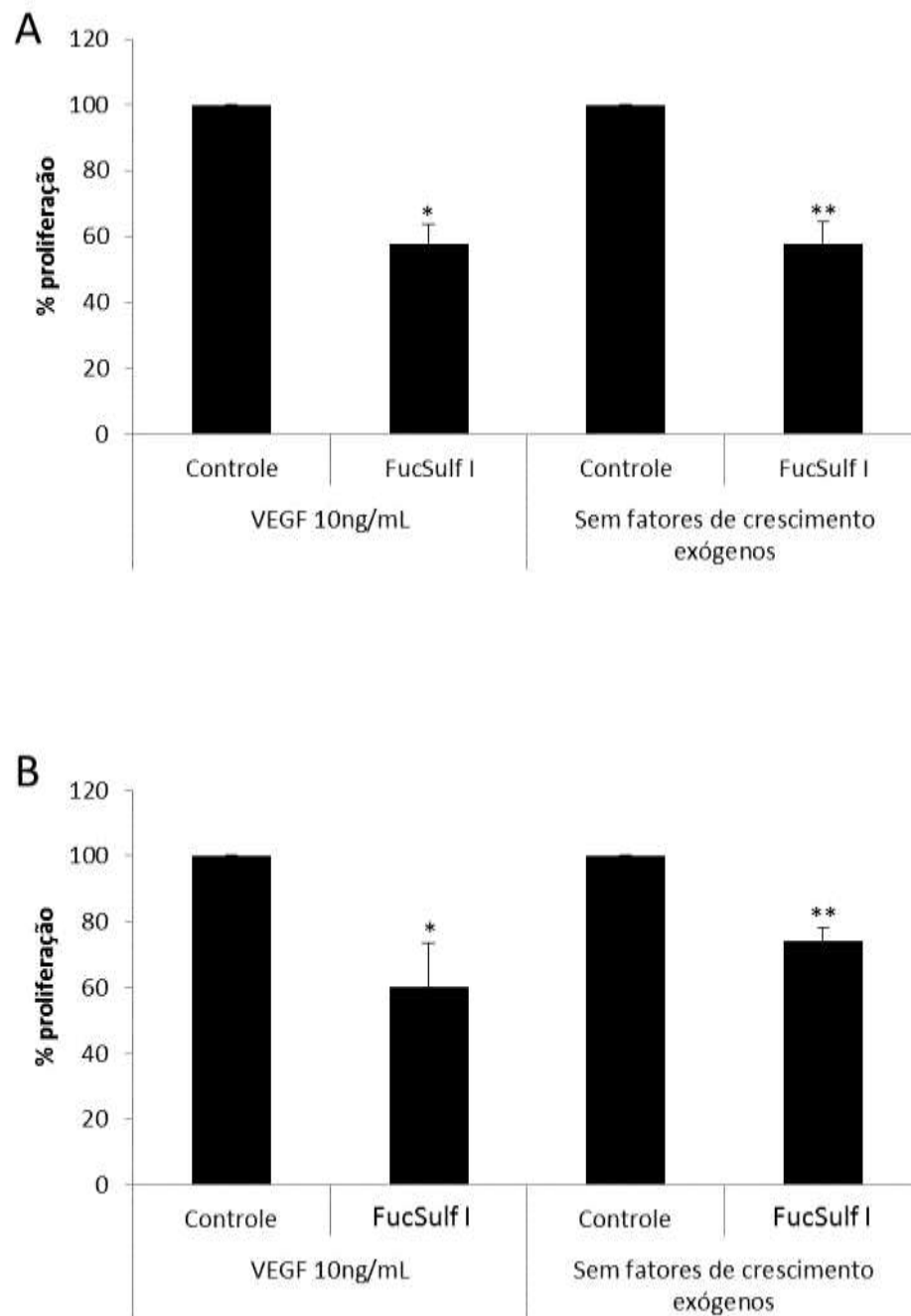


Figura 17. A *FucSulf I* inibe a proliferação celular na presença e na ausência de fatores de crescimento exógenos. As linhagens tumorais DU-145(A) e PC-3(B) foram semeadas ($0,3 \times 10^5$ células/cm²) em placa de 96 poços. Após duas horas de adesão, o meio foi retirado e os poços incubados com o polissacarídeo solúvel (100 µg/mL) em meio RPMI contendo VEGF (10 ng/mL) ou em meio RPMI sem SFB. O número de células de cada condição foi determinada pelo método MTT (1mg/mL) em 48 horas. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

3.7 A FucSulf I inibe vias de sinalização envolvidas na sobrevivência e proliferação tumoral.

Para elucidar os mecanismos pelos quais a FucSulf I inibe a proliferação tumoral, avaliamos a ativação de proteínas intracelulares classicamente moduladas por fatores de crescimento, como a AKT e a ERK. As células tumorais foram incubadas por 48 horas com a FucSulf I e o extrato celular submetido à eletroforese SDS-Page seguido de *western-blotting*, onde obtivemos as revelações das bandas representativas de cada proteína de interesse. As células DU-145 incubadas por 48 horas com a FucSulf I tiveram a diminuição da fosforilação da ERK em relação ao grupo controle (Figura 18A), enquanto na linhagem PC-3 não foram observadas diferenças entre o grupo controle e o tratado (resultados não mostrados). A FucSulf I diminuiu a fosforilação da AKT na linhagem PC-3 (Figura 18B), não influenciando na fosforilação desta proteína na linhagem DU-145 (resultados não mostrados) e sugerindo que os mecanismos envolvidos na inibição da proliferação das duas linhagens são diferentes.

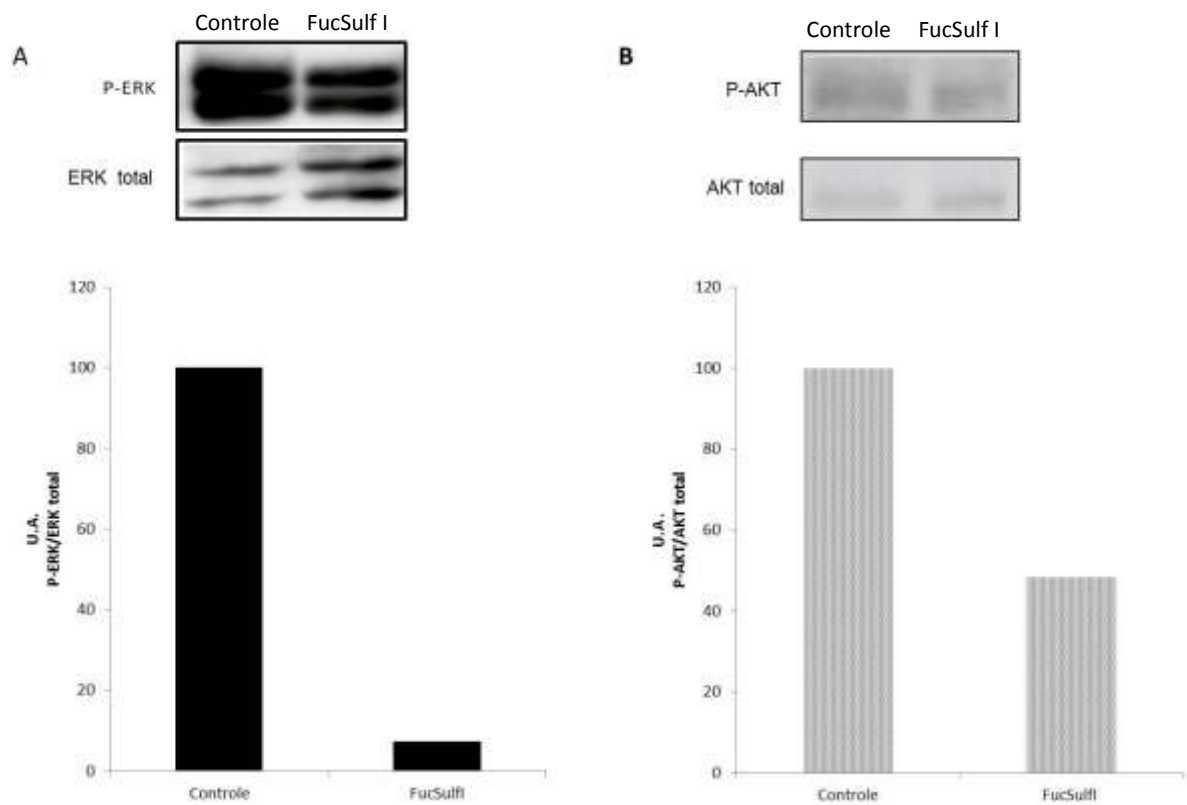


Figura 18. *FucSulf I* inibe a ativação da ERK e AKT. As células tumorais ($0,6 \times 10^5$ células/cm²) DU-145 (A) e PC-3 (B) foram plaqueadas em placas de 6 poços. Depois de duas horas de adesão, as células foram incubadas com o polissacarídeo solúvel (100 µg/mL) em meio RPMI com 5% de SFB por 48 horas. A monocamada de células foi tratada com tampão de lise contendo Tris, Triton 1% e inibidores de fosfatase. Os extratos celulares foram analisados por SDS-Page e Western Blotting.

4 DISCUSSÃO

O câncer de próstata tem uma alta taxa de cura quando detectado ainda na próstata, mas uma vez que a doença tenha se instalado em outros locais como ossos, cérebro e pulmões, os tratamentos se mostram menos eficazes (Sturge *et al*, 2011). O aumento na sobrevida de pacientes com câncer de próstata requer a identificação de novos alvos terapêuticos baseados no entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na disseminação metastática e crescimento tumoral.

A metástase é o processo através do qual as células tumorais deixam o tumor primário e formam tumores secundários em sítios distantes. O sucesso da metástase depende de uma complexa cascata molecular compreendendo várias etapas interligadas por interações adesivas e processos invasivos. Nesse processo, as células tumorais são submetidas aos mais diferentes microambientes, como o estroma do tumor primário, a circulação sanguínea e o novo local de colonização. A capacidade de interagir com componentes destes microambientes vai permitir a disseminação das células tumorais (Fidler, 2003).

As etapas do processo de extravasamento das células tumorais são as mesmas envolvidas na diapedese dos leucócitos em processos inflamatórios, como rolamento e adesão ao endotélio e transmigração. Mas, enquanto os leucócitos causam alterações temporárias na integridade endotelial, a interação das células tumorais com o endotélio pode gerar danos irreversíveis à arquitetura endotelial. Os leucócitos e plaquetas auxiliam no ancoramento das células tumorais ao endotélio, podendo mediar esse contato (Strell & Entschladen, 2008).

A interação entre as células tumorais, os componentes do endotélio, leucócitos e plaquetas é mediada por selectinas e carboidratos expressos na superfície das células tumorais. A expressão de moléculas de adesão no endotélio e a ativação de plaquetas estão normalmente associadas a ambientes inflamatórios. Em uma revisão do seu trabalho em que enumera 6 habilidades básicas necessárias para a transformação de uma célula normal em maligna, Robert Weinberg declara que a instabilidade genômica e a inflamação dão suporte a todas essas transformações (Hanahan & Weinberg, 2011). Induzida por uma ampla gama de estímulos, a citocina TNF- α induz outros mediadores inflamatórios e proteases que orquestram a resposta inflamatória. Esta citocina é produzida pelas células endoteliais e pode regular a expressão de moléculas de adesão celular tais como caderinas, integrinas, selectinas e receptores da superfamília das imunoglobulinas, tanto nas próprias células endoteliais quanto em outras células circulantes (Swerlick & Lawley, 1993).

Polissacarídeos sulfatados, como a heparina, podem diminuir as interações entre as selectinas e carboidratos contendo ácido siálico fucosilado, expressos na superfície de diversos tipos de células tumorais. A atividade biológica da heparina como ligante de selectinas está relacionada à presença de grupos sulfatos carregados negativamente que são reconhecidos por P e L-selectinas (Läubli & Borsig, 2009). Foi observado que a inoculação de heparina em camundongos *knockout* para L-selectina, seguida da inoculação de células tumorais diminuiu a disseminação dessas células pelo organismo do animal (Borsig *et al*, 2002). A administração da heparina inibiu a formação de trombos formados por plaquetas e células tumorais, que são dependentes de P-selectina (Borsig *et al*, 2001). A ação anti-metastática da heparina é, em parte, devido à sua ligação com a P-selectina expressa nas plaquetas, impedindo a formação de heteroagregados com as células tumorais que facilitariam o ancoramento ao endotélio e protegeriam as células tumorais do ataque de células do sistema imune, como as células NK (*natural killers*) (Nieswandt *et al*, 1999).

Apesar da ação anti-metastática da heparina, seu uso na clínica é restrito, pois sua ação anti-coagulante pode trazer efeitos colaterais graves aos pacientes, como hemorragias. Assim como a heparina, outros polissacarídeos sulfatados interagem com a P-selectina e diminuem a interação deste receptor com seus ligantes (Simonis *et al*, 2007).

Fucanas extraídas de algas (fucoidan) e de invertebrados marinhos tem sido alvo de interesse de diversos estudos como alternativa ao uso da heparina. Fucoidans de baixo peso molecular se ligam com maior afinidade à P-selectina do que a heparina (Bachelet *et al*, 2009). Borsig e colaboradores mostraram que o condroitin sulfato fucosilado extraído da parede corporal de uma determinada espécie de pepino-do-mar inibe a interação da P e L-selectina com os ligantes contendo Sialyl Lewis^x *in vitro* e reduz a associação de células tumorais com plaquetas *in vivo* (Borsig *et al*, 2007). Além disso, dermatans sulfato extraídos de ascídias inibem a ligação da P-selectina com seus ligantes e atenuam a metástase em modelos experimentais *in vivo* (Kozlowski *et al*, 2011).

Neste trabalho, avaliamos os efeitos de fucanas extraídas de diferentes espécies de invertebrados marinhos na interação entre linhagens tumorais de próstata (DU-145 e PC-3) e o endotélio. As fucanas utilizadas são compostas por unidades de l-fucose com ligações glicosídicas 1→3 ou 1→4 entre elas, variando no padrão de sulfatação na posição O-2 e O-4. A primeira fucana testada foi a extraída da espécie *Lytechinus variegatus*, FucSulf I, e avaliamos o efeito de diferentes concentrações desta molécula na adesão das células tumorais ao endotélio ativado com TNF- α . Nossos resultados mostram que a FucSulf I inibe a adesão das linhagens PC-3 e DU-145 ao endotélio ativado em um processo dependente da

concentração. Na menor concentração (1µg/mL) não houve inibição significativa, mas a partir de 10 µg/mL é possível observar inibição significativa de 15% na adesão das linhagens ao endotélio. O maior efeito foi na concentração de 100 µg/mL, onde observamos uma inibição de 45% na adesão da linhagem DU-145 e de 25% na linhagem PC-3. Em seguida, testamos também as fucanas extraídas das seguintes espécies: *Strongylocentrotus franciscanus*, *Strongylocentrotus pallidus*, *Arbacia lixula* e *Strongylocentrotus droebachiensis*, além da heparina e avaliamos o potencial de inibição destas moléculas em comparação com os resultados obtidos com a FucSulf I, na concentração de 100 µg/mL. Todas as fucanas testadas inibiram de modo significativo a adesão da linhagem DU-145 ao endotélio. Porém, as fucanas que apresentaram maior potencial inibitório (aproximadamente 45%) foram a FucSulf I e a fucana obtida de *S. franciscanus*. Além disso, apenas as fucanas extraídas de *L. variegatus* e *S. franciscanus* inibiram a adesão da linhagem PC-3 ao endotélio (cerca de 25%), enquanto a heparina não diminuiu a adesão celular em nenhuma condição testada. As diferenças em relação ao potencial inibitório da FucSulf I na DU-145 (45%) e na PC-3 (25%) podem estar relacionadas com a composição de carboidratos de superfície de cada uma.

Uma das hipóteses do presente trabalho seria a possível ligação destas fucanas com P- e E- selectinas expressas no endotélio ativado, impedindo assim, a interação destas selectinas com polissacarídeos expressos nas linhagens tumorais. De fato, já foi descrito que as linhagens DU-145 e PC-3 expressam altos níveis do determinante sialyl Lewis^x, que pode ser reconhecido por selectinas (Dimitroff *et al*, 2004). O reconhecimento de ligantes pela P-selectina é dependente da sulfatação dos mesmos, enquanto ligantes de E-selectina não dependem desta modificação. Dados não publicados obtidos em colaboração com o grupo do professor Paulo Mourão e com o grupo do prof. Lubor Borsig, da Universidade de Zurique, mostram que a FucSulf I se liga à P-selectina imobilizada e não se liga à E-selectina. Estes dados nos sugerem que a inibição da adesão das células tumorais ao endotélio pela FucSulf I possa estar ocorrendo devido à sua ligação com a P-selectina.

O contato das células tumorais com o endotélio é capaz de causar o aumento da permeabilidade vascular, aparentemente ao induzir a desorganização das adesões homofílicas célula-célula mediadas pela VE-caderina, que participa das junções aderentes, e por PCAM-1 (Cai *et al*, 1999; Lewalle *et al*, 1997). Assim, após a adesão inicial das células tumorais ao endotélio, seria estabelecido um contato mais firme que se daria em virtude da exposição da matriz extracelular e da adesão à proteínas da matriz extracelular. Os componentes da matriz contém sítios que são reconhecidos por integrinas e proteoglicanos e a interação entre eles pode controlar a proliferação, remodelamento do citoesqueleto, apoptose e expressão gênica.

Heparans sulfatos expressos na superfície celular atuam como co-receptores de moléculas de adesão, auxiliando no reconhecimento de proteínas da matriz pelas integrinas (Beauvais & Rapraeger, 2004). A matriz subendotelial é formada principalmente por colágeno tipo IV, laminina, trombospondina-1 e fibronectina (Alves *et al*, 2011), todas essas moléculas estão envolvidas em eventos de adesão celular e possuem regiões de ligação com a heparina (Incardona *et al*, 1996; Maldonado & Furcht, 1995; Tang *et al*, 2010; Timpl *et al*, 2000). Trabalhos têm mostrado que a interação de polissacarídeos sulfatados com substratos de laminina, fibronectina ou com receptores de adesão celular podem interferir na adesão célula-matriz e na invasão tumoral (Tang *et al*, 2006; Mishima *et al*, 1998). Avaliamos então o efeito das diferentes fucanas na adesão das células tumorais à matriz subendotelial. A FucSulf I foi a única fucana que inibiu a adesão da linhagem DU-145 à matriz subendotelial ($\cong 20\%$), enquanto a adesão da linhagem PC-3 não foi alterada na presença das fucanas. Como durante o ensaio a FucSulf I interage tanto com a matriz subendotelial quanto com as células tumorais, é preciso investigar se a modulação da adesão ocorre por interações com proteínas de matriz ou com receptores das células tumorais.

A retração endotelial e a exposição da matriz subendotelial precede a migração das células tumorais através do endotélio. Durante o extravasamento, tanto as células tumorais quanto as células endoteliais sofrem mudanças na organização do citoesqueleto. As interações adesivas entre as células tumorais e o endotélio causam a redistribuição de moléculas de adesão do endotélio, como a VE-caderina, levando a dissolução localizada das junções endoteliais, permitindo a passagem das células tumorais (Voura *et al*, 1998). Assim, mecanismos capazes de induzir uma diminuição do contato entre as células tumorais e o endotélio, também poderiam reduzir a retração endotelial, diminuindo, conseqüentemente, a transmigração das células tumorais e a metástase.

Em nossos ensaios a FucSulf I foi uma das fucanas com maior potencial inibitório na adesão das células tumorais ao endotélio e a única que inibiu a adesão da linhagem DU-145 à matriz subendotelial. Desta forma, avaliamos seu efeito na migração transendotelial das linhagens DU-145 e PC-3. As condições tratadas com FucSulf I mostraram cerca de 57% de inibição na transmigração das duas linhagens testadas. A heparina também inibiu a transmigração da linhagem DU-145 em torno de 50% e da linhagem PC-3 em torno de 25%. Nós observamos que o efeito da FucSulf I na transmigração das células tumorais através da monocamada endotelial foi mais potente do que seu efeito na adesão. Três possíveis hipóteses poderiam explicar este maior efeito da FucSulf I no processo de migração transendotelial: a

ligação da FucSulf I à P-selectina, a ligação da FucSulf I a fatores de crescimento e/ou a inibição da atividade de enzimas como a heparanase.

Como mencionado anteriormente, a FucSuf I pode se ligar a P-selectina imobilizada. Esta ligação poderia impedir a interação das células tumorais com o endotélio. A diminuição do número de células aderidas à monocamada pode levar a uma consequente redução do número de células tumorais que transmigram.

Sabe-se que as células tumorais podem secretar enzimas que permitem o remodelamento da matriz extracelular e facilitam a migração transendotelial. A heparanase é uma enzima que cliva heparans-sulfato em sítios contendo pouca sulfatação e a sua expressão está correlacionada com o potencial metastático das células tumorais (Miao *et al*, 2006; Vlodavsky *et al*, 2006). A heparina é um análogo natural dos substratos da heparanase e é considerada um potente inibidor da atividade desta enzima (Vlodavsky *et al*, 1994). Estudos indicam que a heparina, assim como outros polissacarídeos sulfatados que inibem a heparanase, também possuem atividade anti-metastática em modelos animais, enquanto outros polissacarídeos que não inibem a atividade da heparanase não apresentam atividade anti-metastática (Naggi *et al*, 2005; Irimura *et al*, 1986; Parish *et al*, 1987). As linhagens utilizadas no trabalho secretam heparanase, sendo que a DU-145 apresenta maior expressão desta enzima que a PC-3 (Lerner *et al*, 2008). Assim, como mencionado acima, a possível ligação da FucSulf I com a heparanase secretada pelas células tumorais poderia inibir a atividade desta enzima, impedindo a migração das células tumorais através da monocamada endotelial.

Fatores de crescimento heparano-dependentes, como o EGF, FGF e o VEGF, possuem sítios de ligação com a heparina e com heparans-sulfato, assim como o receptor VEGFR-2 (Dougher *et al*, 1997). Outra hipótese plausível seria a ligação da FucSulf I com fatores de crescimento secretados pelas células tumorais ao longo do período de interação, impedindo que estes fatores exerçam seus efeitos. Um possível candidato seria o VEGF. Estudos mostram que a ligação do VEGF com a heparina e/ou seus derivados pode modular a interação entre o fator de crescimento e os seus receptores. Além disso, a modulação da ligação do VEGF com seus receptores por fontes exógenas de heparina pode variar devido à presença de heparans-sulfato na superfície celular (Terman *et al*, 1994, Wijelath *et al*, 2010). A ativação do VEGFR-2 nas células endoteliais induz um aumento da fosforilação de componentes das junções aderentes como VE-caderina, β -catenina e p120, o que desestabiliza as junções intercelulares e leva ao aumento da permeabilidade vascular (Esser *et al*, 1998), facilitando a migração transendotelial das células tumorais.

Avaliamos então a produção de VEGF pelas linhagens utilizadas no trabalho. A partir de 8 horas já é possível detectar quantidades significativas de VEGF no meio condicionado das células. Além disso, a linhagem DU-145 produz maiores quantidades de VEGF do que a PC-3, em todos os tempos testados. Ao avaliar a ligação da FucSulf I e da heparina ao VEGF, observamos que os dois polissacarídeos se ligam ao fator de crescimento, sendo que a FucSulf I se liga ao VEGF com maior avidéz. Desta forma, a FucSulf I poderia estar interferindo na ligação do VEGF com seus receptores endoteliais, mantendo a integridade da monocamada e impedindo a migração transendotelial das células. Este efeito ainda pode ser maior devido à ativação das células endoteliais. O TNF- α além de induzir a expressão de moléculas de adesão, também altera a expressão de receptores de VEGF nas células endoteliais. Estudos indicam que o pré-tratamento de células endoteliais com TNF- α aumenta a expressão do receptor VEGFR-2 e a resposta celular ao VEGF (Giraudo *et al*, 1998); Sainson *et al*, 2008). Como nos ensaios de transmigração, as células endoteliais são pré-tratadas por 4 horas com TNF- α é provável que a expressão de VEGFR-2 dessas células esteja aumentada. Com isso, aumenta-se o potencial inibitório da FucSulf I na migração transendotelial.

O potencial anti-proliferativo de polissacarídeos sulfatados de origem marinha vem sendo estudado e é cada vez maior a variedade de fucanas que apresentam este efeito anti-tumoral. Os mecanismos de inibição da proliferação ainda não estão bem estabelecidos e variam de acordo com a linhagem e a molécula utilizada. Um estudo avaliou o efeito do fucoidan de alga marrom na proliferação de linhagens tumorais de hepatocarcinoma, carcinoma de vesícula, colangiocarcinoma, carcinoma de células renais, carcinoma de ovário, neuroblastoma e hepatoblastoma. Os resultados indicaram que a supressão da proliferação foi mais aparente nas linhagens de hepatocarcinoma, colangiocarcinoma e carcinoma de vesícula, indicando que o efeito anti-neoplásico do fucoidan pode variar de acordo com o tipo de tumor (Fukahori *et al*, 2008). Outros trabalhos avaliam os mecanismos envolvidos na inibição do crescimento tumoral. Já foram observadas alterações no ciclo celular de linhagens tratadas com fucoidans, como o bloqueio da fase G₁ em células de carcinoma broncopulmonar (Riou *et al*, 1996), enquanto outros trabalhos mostram que a diminuição da proliferação celular causada pelo fucoidan ocorre devido à indução da apoptose celular pela ativação de caspases em linhagens de linfoma e de câncer de cólon (Aisa *et al*, 2005; Kim *et al*, 2010).

Avaliamos o efeito da FucSulf I na proliferação das linhagens tumorais na presença de 5% de soro fetal bovino. A fucana apresentou um potencial inibitório a partir de 24 horas, atingindo em torno de 30% de inibição na linhagem DU-145 e 20% na linhagem PC-3 ao

longo de 72 horas. As condições incubadas com a heparina não apresentaram alterações no número de células em relação às condições controle. Como outros polissacarídeos sulfatados que regulam a proliferação celular induzem a apoptose, investigamos se a FucSulf I induz a morte celular e vimos que não há diferença significativa da porcentagem de células viáveis encontradas nas condições tratadas com a fucana em relação à condição controle, indicando que a FucSulf I possa estar modulando realmente alguma etapa associada a ativação do ciclo celular.

A descoberta de receptores de VEGF nas células tumorais, fez com que o papel do VEGF na biologia tumoral não ficasse restrito às células endoteliais e à contribuição na vascularização tumoral. A produção de VEGF pelas células tumorais e a expressão de VEGFRs indicam que estas células podem responder de modo autócrino ao VEGF. O bloqueio dos receptores de VEGF por anticorpos ou a inibição da produção de VEGF em linhagens que possuem VEGFRs levam à diminuição da proliferação celular (Masood *et al*, 2001). Além de modular a interação do VEGF ao VEGFR, como já discutido, derivados de heparina também interferem na ligação do VEGF com a neuropilina-1 (Lake *et al*, 2006). Diversas linhagens tumorais de carcinoma de próstata, mama, estômago, cólon e ovário expressam NRP-1 e a sua presença está associada ao aumento da proliferação, migração e sobrevivência destas células (Bagri *et al*, 2009). Estudos indicam que as linhagens DU-145 e PC-3 expressam receptores de VEGF, como a neuropilina-1 e a expressão de VEGFR-2 nessas linhagens ainda é controversa (Jackson *et al*, 2002; Jia *et al*, 2010; Soker *et al*, 1998).

Uma vez que a FucSulf I diminuiu a proliferação das linhagens tumorais, nossa hipótese era de que ela poderia interferir na ligação dos fatores de crescimento presentes no SFB, como o VEGF, aos seus receptores nas células tumorais. Para avaliar se a ligação da FucSulf I ao VEGF interfere na proliferação celular, investigamos o efeito da fucana na proliferação das linhagens na presença de VEGF e na ausência de fatores exógenos. A proliferação das linhagens foi inibida nas duas condições testadas. Na linhagem DU-145, tanto na presença do VEGF quanto na ausência de fatores exógenos, a proliferação foi inibida cerca de 40%. Na linhagem PC-3, houve maior inibição da proliferação na presença do VEGF exógeno, cerca de 40%, enquanto na ausência de fatores exógenos, a inibição foi de 25%. Este fato pode ser devido à linhagem PC-3 secretar uma concentração menor de VEGF ao longo do tempo em comparação à linhagem DU-145.

Entretanto, não foi observado aumento na proliferação da linhagem DU-145 na presença do VEGF em relação à condição sem fatores exógenos, enquanto pudemos observar que na linhagem PC-3 este fator de crescimento, ao ser acrescentado ao meio, induziu um

aumento na proliferação em relação ao controle (meio puro) (resultados não mostrados). O fato do VEGF não aumentar a proliferação da linhagem DU-145 pode indicar que a concentração de VEGF produzido pelas células tumorais já é suficiente para saturar os receptores das células. Entretanto, não podemos descartar a hipótese de que a DU-145 possa não responder ao VEGF. Desta forma, a inibição da proliferação desta linhagem celular pela FucSulf I poderia ser devido a ligação desta fucana com outros fatores de crescimento heparano-dependentes secretados pelas células tumorais. Já foi descrito que a DU-145 secreta também EGF e FGF (Tillotson & Rose, 1991; Ozen *et al*, 2001).

A ligação de fatores de crescimento aos seus receptores dispara vias de sinalização relacionadas ao aumento do potencial invasivo das células tumorais, como proliferação, viabilidade e migração celular. As vias de sinalização PI3K/AKT e Raf/MEK/ERK atuam na transmissão de sinais proliferativos de receptores da membrana plasmática, através de cascatas de ativação de quinases que são reguladas por quinases específicas, fosfatases, e proteínas adaptadoras (Steelman *et al*, 2011). Depois de ativada, a ERK fosforila moléculas de regulação da apoptose e componentes da organização do citoesqueleto. A ERK também transloca para o núcleo onde fosforila fatores de transcrição, que se associam às regiões promotoras de diversos genes, ativando a transcrição de fatores de crescimento e citocinas (Rodríguez-Berriguete *et al*, 2012). Assim como a ERK, quando ativada, a AKT pode translocar para o núcleo e regular a ativação de fatores de transcrição relacionados com a proliferação e sobrevivência celular. Além disso, a AKT tem como alvo outras moléculas que interferem diretamente na manutenção do estado de sobrevivência da célula (Hers *et al*, 2011). Estudos mostram que a sinalização autócrina do VEGF em linhagens tumorais de mama que expressam neuropilina-1 mantém a ativação da via PI3K/AKT, aumentando seu potencial proliferativo (Bachelder *et al*, 2001; Barr *et al*, 2008). Outro trabalho indica que a linhagem DU-145 pode responder de modo autócrino ao FGF-2 e o tratamento com este fator de crescimento aumenta fosforilação da ERK1/2 e não ativa via PI3K/AKT (Puhr *et al*, 2010).

Como a FucSulf I diminuiu a proliferação celular, avaliamos o estado de ativação das proteínas ERK e AKT nas células tumorais tratadas por 48 horas com a FucSulf I. Observamos que em cada linhagem há a modulação de vias diferentes. Na linhagem DU-145, há uma redução significativa da ativação da ERK na condição tratada com a FucSulf I, enquanto não foi observada diferenças na ativação da AKT. Na linhagem PC-3, podemos observar que a ativação da AKT foi reduzida pelo tratamento com a fucana. Entretanto, não foi possível detectar a ativação da ERK nem na condição controle. Trabalhos mostram que a DU-145 possui maiores níveis de ERK ativada do que de AKT ativada e já foi descrito que a

linhagem PC-3 apresenta grande atividade da proteína AKT e baixos níveis de atividade da via Raf/MEK/ERK (McCubrey *et al*, 2007; Robertson *et al*, 2010; Dizeyi *et al*, 2011). Assim, é provável que o tratamento com a FucSulf I tenha interferido apenas na via que está primordialmente ativada em cada linhagem, a via Raf/MEK/ERK na DU-145 e PI3K/AKT na PC-3.

Em todos os ensaios obtivemos diferenças nos resultados entre as duas linhagens, seja no grau de inibição da interação com o endotélio, na síntese de VEGF ou na via de sinalização intracelular modulada. Isso pode indicar que os resultados observados dependem das características próprias de cada linhagem em associação com as diferenças na estrutura dos polissacarídeos testados.

Diversos estudos mostram que a posição dos grupos sulfato e/ou o grau de sulfatação da heparina e seus derivados são importantes para a atividade biológica desses compostos. A heparina possui sulfatação nas posições O-2 de um resíduo e nas posições N-2, O-6 em outro (Figura 5). A retirada do grupo 2-O-sulfato diminui a interação da heparina com FGF, assim como a retirada do grupo 6-O-sulfato diminui a ligação com o FGF-R, ou seja, a ligação da heparina e seus derivado com o FGF depende da presença do grupo 2-O-sulfato e a ligação com FGFR depende do grupo 6-O-sulfato (Ashikari-Hada *et al*, 2004).

A ligação da heparina com o VEGF também está relacionada com a presença dos grupos O-sulfato. Heparinas O-dessulfatadas N-sulfatadas não apresentam afinidade com VEGF e a retirada apenas do grupo 2-O sulfato ou 6-O-sulfato diminui a afinidade desses derivados em relação à heparina não modificada (Ashikari-Hada *et al*, 2005). Um trabalho utilizou polissacarídeos sintéticos com diferentes graus de sulfatação para avaliar a influência desse parâmetro na inibição da P-selectina. Os polissacarídeos com maiores graus de sulfatação apresentaram maior inibição do rolamento de monócitos sobre superfície contendo P-selectina imobilizada (Fritzsche *et al*, 2006).

As fucanas utilizadas no trabalho variam na estrutura e na sulfatação das unidades sacarídicas de repetição, como mostrado na figura 7. A FucSulf I é a única fucana com sulfatação O-2 e O-4 no mesmo resíduo e possui maior número de radicais sulfato por unidade de repetição. Além de ser a fucana com maior potencial inibitório da adesão das células tumorais ao endotélio, resultados preliminares indicam que de todas as fucanas utilizadas no trabalho, ela é a que se liga com maior avidéz ao VEGF (resultados não mostrados). Como descrito acima, tanto a ligação com a P-selectina quanto com o VEGF pode depender da estrutura dos polissacarídeos. Apesar de não termos nenhum resultado

relacionando a estrutura da FucSulf I com suas funções biológicas, suas características exclusivas podem ser responsáveis pelos resultados obtidos até agora.

A FucSulf I modula, em modelos *in vitro*, todas as etapas relacionadas com a disseminação metastática. Ao interferir na adesão tumoral ao endotélio, no extravasamento e na proliferação celular, esses efeitos se somam, reduzindo as chances de uma célula que sai do tumor primário e entra na circulação, conseguir se estabelecer num sítio secundário no organismo. Concluimos então, que a FucSulf I pode ser uma importante molécula na busca de novos fármacos que atuem na inibição da metástase.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Conclusões

Neste trabalho, demonstramos que :

- Todas as fucanas testadas inibiram a adesão da linhagem tumoral DU-145 à monocamada endotelial. Entretanto, a fucana extraída de *L.variegatus* (FucSulf I) e de *S. franciscanus*, foram as que apresentaram maior potencial inibitório.
- Em relação à linhagem PC-3, a adesão às células endoteliais foi inibida apenas na presença da FucSulf I e da fucana extraída de *S. franciscanus*.
- Somente a FucSulf I inibiu a adesão da linhagem DU-145 à matriz subendotelial, enquanto nenhuma fucana foi capaz de inibir a adesão da linhagem PC-3 à esta matriz.
- A FucSulf I foi capaz de inibir a migração transendotelial das linhagens Du-145 e PC-3. Este efeito pode estar relacionado com a interação desta fucana com o VEGF, uma vez que ambas as linhagens secretam este fator de crescimento e que ensaios de Elisa demonstraram a ligação direta desta fucana ao VEGF.
- A FucSulf I inibiu a proliferação das linhagens tumorais e não apresentou efeitos citotóxicos.
- A FucSulf I diminuiu a ativação de proteínas envolvidas na sinalização intracelular moduladas por fatores de crescimento, como a ERK, na linhagem DU-145 e a AKT, na linhagem PC-3.
- Nossos dados indicam uma grande versatilidade nas ações biológicas da FucSulf I sobre as células tumorais e suas interações com o endotélio, tornando-a um interessante protótipo de molécula com potencial terapêutico, visando o controle de etapas-chave da progressão tumoral.

2. Perspectivas

Pretendemos dar continuidade ao trabalho apresentado, aprofundando o conhecimento sobre os efeitos anti-tumorais da FucSulf I e os mecanismos envolvidos. Temos como perspectivas:

- Avaliar e comparar o papel da FucSulf I na adesão e migração transendotelial de linhagens de tumorais de próstata, mama e melanoma em condições estáticas e dinâmicas.
- Investigar a ligação da FucSulf I a diferentes fatores de crescimento heparino-dependentes (FGF, EGF, etc), assim como a secreção desses fatores pelas linhagens tumorais.
- Avaliar os mecanismos celulares ativados por fatores de crescimento que podem ser modulados pela FucSulf I, como por exemplo, a permeabilidade endotelial, o padrão de expressão e de fosforilação de moléculas de adesão celular, a ativação de receptores de fatores de crescimento e a ativação de vias de sinalização.
- Avaliar o papel da FucSulf I na proliferação de linhagens tumorais de mama e de melanoma.
- Avaliar o efeito da FucSulf I na diferenciação endotelial em estruturas semelhantes a capilares *in vitro* (tubulogênese).
- Avaliar o efeito da FucSulf I na no crescimento tumoral, na metástase e na angiogênese *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- Aisa Y, Miyakawa Y, Nakazato T, Shibata H, Saito K, Ikeda Y et al. Fucoïdan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *American Journal of Hematology*. 2005;78(1):7-14.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010; 1396p.
- Alves AP, Mulloy B, Diniz JA, Mourão PA. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(11):6965-6971.
- Alves TR, da Fonseca AC, Nunes SS, da Silva AO, Dubois LG, Faria J, et al. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Experimental Cell Research*. 2011; 317(15): 2073-2085.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Research*. 1999; 85(3):221-228.
- Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Itoh N, Reddi AH, Kimata K. Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(13):12346-12354.
- Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K. Heparin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor165-dependent Mitogenic Activity, Tube Formation, and Its Receptor Phosphorylation of Human Endothelial Cells: COMPARISON OF THE EFFECTS OF HEPARIN AND MODIFIED HEPARINS. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(36): 31508-31515.
- Aviezer D, Yayon A. Heparin-dependent binding and autophosphorylation of epidermal growth factor (EGF) receptor by heparin-binding EGF-like growth factor but not by EGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91(25):12173-12177.
- Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Research*. 2001; 61(15): 5736-5740.
- Bachelet L, Bertholon I, Lavigne D, Vassy R, Jandrot-Perrus M, Chaubet F, et al. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2009; 1790(2): 141-146.
- Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts R.J. Neuropilins in tumor biology. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(6):1860-1864.

- Barr MP, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JJ. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *International Journal of Oncology*. 2008; 32(1):41-48.
- Beauvais DM, Rapraeger AC. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*. 2004; 2: p.3.
- Berteau O, Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*. 2003;13(6): 29R-40R.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987; 84(24): 9238-9242.
- Bodenstine TM, Welch DR. Metastasis suppressors and the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*. 2008; 1(1): 1-11.
- Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98(6): 3352-3357.
- Borsig L, Wang L, Cavalcante MC, Cardilo-Reis L, Ferreira PL, Mourão PA, et al. Selectin Blocking Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan from Sea Cucumber: EFFECT ON TUMOR METASTASIS AND NEUTROPHIL RECRUITMENT. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(20):14984-14991.
- Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(4):2193-2198.
- Boyle P, Levin B. *World Cancer Report 2008*, IARC, Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2008.
- Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DM. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta histochemica*. 2010;112(1):3–25.
- Browaeys-Poly, E, Perdereau D, Lescuyer A, Burnol AF, Cailliau K. Akt interaction with PLC(γ) regulates the G(2)/M transition triggered by FGF receptors from MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Research*. 2009; 29(12):4965-4969.
- Brown JR, Fuster MM, Li R, Varki N, Glass CA, Esko JD. A disaccharide-based inhibitor of glycosylation attenuates metastatic tumor cell dissemination. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2006; 12(9):2894-2901.
- Cai, J, Jiang WG, Mansel, RE. Phosphorylation and disorganization of vascular-endothelial cadherin in interaction between breast cancer and vascular endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 1999;4(2):191-195.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-257.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(14): 7709-7712.

Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Letters*. 2002;176(2):123-128.

Chevalier S, Defoy I, Lacoste J, Hamel L, Guy L, Bégin LR, et al. Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;189(1-2):169-179.

Chua CC, Rahimi N, Forsten-Williams K, Nugent MA. Heparan sulfate proteoglycans function as receptors for fibroblast growth factor-2 activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Circulation Research*. 2004;94(3):316-323.

Dall'Olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate Journal*. 2001;18(11-12): 841-850.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001;412(6849): 822-826.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-3290.

Diamandis EP. Prostate specific antigen--new applications in breast and other cancers. *Anticancer Research*. 1996;16(6C):3983-3984.

Diamandis EP, Yu H. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *The Urologic Clinics of North America*. 1997;24(2):275-282.

Dimitroff CJ, Lechpammer M, Long-Woodward D, Kutok JL. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Research*. 2004;64(15):5261-5269.

Dizeyi N, Hedlund P, Bjartell A, Tinzl M, Austild-Taskén K, Abrahamsson PA. Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. *Urologic Oncology*. 2011;29(4):436-445.

Dougher AM, Wasserstrom H, Torley L, Shridaran L, Westdock P, Hileman RE, et al. Identification of a heparin binding peptide on the extracellular domain of the KDR VEGF receptor. *Growth Factors*. 1997;14(4):257-268.

Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of Cell Science*. 1998;111(Pt 13):1853-1865.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, acesso em dez 2011.

- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;161(2):851-858.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews. Cancer*. 2003;3(6):453-458.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*. 1971;285(21):1182-1186.
- Friedl P, Wolf K. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Research*. 2008;68(18):7247-7249.
- Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews. Cancer*. 2003;3(5):362-374.
- Fritzsche J, Alban S, Ludwig RJ, Rubant S, Boehncke WH, Schumacher G, et al. The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity. *Biochemical pharmacology*. 2006;72(4): 474–485.
- Fukahori S, Yano H, Akiba J, Ogasawara S, Momosaki S, Sanada S, et al. Fucoidan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines in vitro. *Molecular Medicine Reports*. 2008;1(4):537-542.
- Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews. Cancer*. 2005;5(7):526–542.
- Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nature Reviews. Cancer*. 2011;11(2):123-134.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*. 2003;161(6):1163-1177.
- Giraud E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, et al. Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(34):22128-22135.
- Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5(5):1063-1071.
- Graells J, Vinyals A, Figueras A, Llorens A, Moreno A, Marcoval J, et al. Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2004;123(6):1151-1161.

Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O, Hanahan D, Johnson RS. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Research*. 1999;59(7):1592-1598.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.

Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews. Cancer*. 2002;2(1):38-47.

Heer R, Douglas D, Mathers ME, Robson CN, Leung HY. Fibroblast growth factor 17 is over-expressed in human prostate cancer. *The Journal of Pathology*. 2004;204(5):578-586.

Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cellular Signalling*. 2006; 18(12):2089-2097.

Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*. 2011;23(10):1515-1527.

Hicklin DJ. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;23(5):1011-1027.

Hirata A, Ogawa S, Kometani T, Kuwano T, Naito S, Kuwano M, et al. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Research*. 2002;62(9):2554-2560.

Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews. Cancer*. 2004;4(1):45-60.

Honn KV, Tang DG, Grossi IM, Renaud C, Duniec ZM, Johnson CR, et al. Enhanced endothelial cell retraction mediated by 12(S)-HETE: a proposed mechanism for the role of platelets in tumor cell metastasis. *Experimental Cell Research*. 1994;210(1): 1-9.

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(36):26031-26037.

Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006;38(12):2018-2039.

Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, et al. Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Research*. 2004;64(23):8613-8619.

Incardona F, Lawler J, Cataldo D, Panet A, Legrand Y, Foidart JM, et al. Heparin-binding domain, type 1 and type 2 repeats of thrombospondin mediate its interaction with human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1996;62(4):431-442.

- Irimura T, Nakajima M, Nicolson GL. Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase (heparanase) of metastatic melanoma cells. *Biochemistry*. 1986;25(18):5322-5328.
- Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C, et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Research*. 2002;62(3): 854-859.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of Clinical Investigation*. 1973;52(11):2745-2756.
- Jahroudi N, Greenberger JS. The role of endothelial cells in tumor invasion and metastasis. *Journal of Neuro-Oncology*. 1995; 23(2):99-108.
- Jia H, Cheng L, Tickner M, Bagherzadeh A, Selwood D, Zachary I. Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity. *British Journal of Cancer*. 2010;102(3): 541-552.
- Kannagi R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconjugate Journal*. 1997;14(5):577-584.
- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996; 88(9):3259-3287.
- Kim EJ, Park SY, Lee JY, Park JH. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterology*. 2010;10:96.
- Kozłowski EO, Pavao MSG, Borsig L. Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2011;9(9):1807-1815.
- Krause T, Turner GA. Are selectins involved in metastasis? *Clinical & Experimental Metastasis*. 1999;17(3):183-192.
- Kreis T, Vale R. Guidebook to the extracellular matrix, anchor and adhesion proteins. New York: Oxford University Press, 1999; 568p.
- Lake AC, Vassy R, Di Benedetto M, Lavigne D, Le Visage C, Perret GY, et al. Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(49):37844-37852.
- Läubli H, Stevenson JL, Varki A, Varki NM, Borsig L. L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Research*. 2006;66(3):1536-1542.
- Läubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Seminars in cancer biology*. 2010;169–177.

Läubli H, Borsig L. Heparins Attenuate Cancer Metastasis: Are Selectins the Link? *Cancer Investigation*. 2009;7(5):274-481.

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and Cellular Biology*. 2001;21(12):3995-4004.

Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *International Journal of Oncology*. 2009;34(4):881-895.

Lerner I, Baraz L, Pikarsky E, Meirovitz A, Edovitsky E, Peretz T, et al. Function of heparanase in prostate tumorigenesis: potential for therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(3):668-676.

Levy-Adam F, Ilan N, Vlodavsky I. Tumorigenic and adhesive properties of heparanase. *Seminars in Cancer Biology*. 2010;20(3):153-160.

Lewalle JM, Bajou K, Desreux J, Mareel M, Dejana E, Noël A, Foidart JM. Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro. *Experimental Cell Research*. 1997;237(2):347-356.

Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2003;2(4):339-345.

Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*. 2001;61(3):253-270.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991;64(2):327-336.

Mahtouk K, Cremer FW, Rème T, Jourdan M, Baudard M, Moreaux J, et al. Heparan sulphate proteoglycans are essential for the myeloma cell growth activity of EGF-family ligands in multiple myeloma. *Oncogene*. 2006;25(54):7180-7191.

Maldonado BA, Furcht LT. Involvement of integrins with adhesion-promoting, heparin-binding peptides of type IV collagen in cultured human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1995;36(2): 364-372.

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-1274.

Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood*. 2001;98(6):1904-1913.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2007;1773(8):1263-1284.

McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of Clinical Investigation*. 1989;84(1):92-99.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf> , acesso em fev 2012.

Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(14):2787-2799.

Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, Ishai-Michaeli R, Stein CA, Vlodavsky I. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*. 1999;83(3):424-431.

Miao H-Q, Liu H, Navarro E, Kussie P, Zhu Z. Development of heparanase inhibitors for anti-cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 2006;13(18):2101-2111.

Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2007;25(4):305-324.

Mishima T, Murata J, Toyoshima M, Fujii H, Nakajima M, Hayashi T, et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (Ca-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Clinical & Experimental Metastasis*. 1998;16(6):541-550.

Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Science*. 2006;97(5):341-347.

Mourão PA, Bastos IG. Highly acidic glycans from sea cucumbers. Isolation and fractionation of fucose-rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 1987;166(3):639-645.

Mulloy B, Ribeiro AC, Alves AP, Vieira RP, Mourão PA. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(35):22113-22123.

Naggi A, Casu B, Perez M, Torri G, Cassinelli G, Penco S, et al. Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-acetylation, and glycol splitting. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(13):12103-12113.

Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Research*. 1999;59(6):1295-1300.

Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Research*. 2008;68(10):3645-3654.

Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 2000;22(2):108-112.

Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1992;12(1):240-247.

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology*. 2001;2(3):REVIEWS3005.

Ozen M, Giri D, Ropiquet F, Mansukhani A, Ittmann M. Role of fibroblast growth factor receptor signaling in prostate cancer cell survival. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(23):1783-1790.

Parish CR, Coombe DR, Jakobsen KB, Bennett FA, Underwood PA. Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumour metastasis by blocking tumour-cell-derived heparanases. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*. 1987;40(4):511-518.

Paschos KA, Canovas D, Bird NC. The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cellular signalling*. 2009;21(5):665–674.

Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*. 2011;55(4-5):353-363.

Pereira MS, Melo FR, Mourão PA. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology*. 2002;12(10):573–580.

Pereira MS, Mulloy B, Mourão PA. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(12):7656–7667.

Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*. 1999;98(5):641-650.

Pomin VH. Review: An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. *Biopolymers*. 2009;91(8):601-609.

Pomin VH, Mourão PAS. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*. 2008;18(12):1016-1027.

Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;12(3):129-135.

Puhr M, Santer FR, Neuwirt H, Marcias G, Hobisch A, Culig Z. SOCS-3 antagonises the proliferative and migratory effects of fibroblast growth factor-2 in prostate cancer by inhibition of p44/p42 MAPK signalling. *Endocrine-Related Cancer*. 2010;17(2):525-538.

Riou D, Colliec-Jouault S, Pinczon du Sel D, Bosch S, Siavoshian S, Le Bert V, et al. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Anticancer Research*. 1996;16(3A):1213-1218.

Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3291-3310.

Robertson BW, Bonsal L, Chellaiah MA. Regulation of Erk1/2 activation by osteopontin in PC3 human prostate cancer cells. *Molecular Cancer*. 2010;9:260.

Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of cell science*. 2001;114(5):853.

Rodríguez-Berriguete G, Fraile B, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M. MAP Kinases and Prostate Cancer. *Journal of Signal Transduction*. 2012:169170.

Ropiquet F, Giri D, Kwabi-Addo B, Mansukhani A, Ittmann M. Increased expression of fibroblast growth factor 6 in human prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Cancer Research*. 2000;60(15):4245-4250.

Sainson RCA, Johnston DA, Chu HC, Holderfield MT, Nakatsu MN, Crampton SP, et al. TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood*. 2008;111(10):4997-5007.

Savage CR, Jr, Inagami T, Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972;247(23):7612-7621.

Savorè C, Zhang C, Muir C, Liu R, Wyrwa J, Shu J, et al. Perlecan knockdown in metastatic prostate cancer cells reduces heparin-binding growth factor responses in vitro and tumor growth in vivo. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2005;22(5):377-390.

Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of Cellular Physiology*. 2009;218(3):460-466.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587):983-985.

Simonis D, Fritzsche J, Alban S, Bendas G. Kinetic analysis of heparin and glucan sulfates binding to P-selectin and its impact on the general understanding of selectin inhibition. *Biochemistry*. 2007;46(20):6156-6164.

Skinner MP, Lucas CM, Burns GF, Chesterman CN, Berndt MC. GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(9):5371-5374.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998;92(6):735-745.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005;9(1):59-71.

Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*. 2011;3(3):192-222.

Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling*. 2008;6(1):10.

Sturge J, Caley MP, Waxman J. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews. Clinical Oncology*. 2011;8(6):357-368.

Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Reviews*. 2007;26(2):319-331.

Suva LJ, Washam C, Nicholas RW, Griffin RJ. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Endocrinology*. 2011;7(4):208-218.

Swerlick RA, Lawley TJ. Role of microvascular endothelial cells in inflammation. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1993;100(1):111S-115S.

Takazaki R, Shishido Y, Iwamoto R, Mekada E. Suppression of the biological activities of the epidermal growth factor (EGF)-like domain by the heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(45):47335-47343.

Tang N-H, Chen YL, Wang XQ, Li XJ, Wu Y, Zou QL, Chen YZ. N-terminal and C-terminal heparin-binding domain polypeptides derived from fibronectin reduce adhesion and invasion of liver cancer cells. *BMC Cancer*. 2010;10:552.

Tang X, Li J, Xin X, Geng M. A new marine-derived sulfated polysaccharide from brown alga suppresses tumor metastasis both in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy*. 2006;5(11):1474-1480.

Terman B, Khandke L, Dougher-Vermazan M, Maglione D, Lassam NJ, Gospodarowicz D, et al. VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. *Growth Factors*. 1994;11(3):187-195.

Tillotson JK, Rose DP. Endogenous secretion of epidermal growth factor peptides stimulates growth of DU145 prostate cancer cells. *Cancer Letters*. 1991;60(2):109-112.

Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E. Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000;19(4):309-317.

Tongers J, Roncalli JG, Losordo DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvascular Research*. 2010; 79(3):200-206.

Tremblay P-L, Auger FA, Huot J. Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene*. 2006;25(50):6563-6573.

Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association*. 2010;31(1):158-175.

Van Meir E. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential to solid tumours. *Neurosurgery*. 1996;39(4):878-879.

Vilela-Silva A-CES, Hirohashi N, Mourão PAS. The structure of sulfated polysaccharides ensures a carbohydrate-based mechanism for species recognition during sea urchin fertilization. *The International Journal of Developmental Biology*. 2008;52(5-6):551-559.

Vlodavsky I, Mohsen M, Lider O, Svahn CM, Ekre HP, Vigoda M, et al. Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. *Invasion & Metastasis*. 1994;14(1-6):290-302.

Vlodavsky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R, et al. The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2006;35(1-2):116-127.

Voura EB, Sandig M, Siu CH. Cell-cell interactions during transendothelial migration of tumor cells. *Microscopy Research and Technique*. 1998;43(3):265-275.

Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer*. 2005;104(2):427-438.

Wijelath E, Namekata M, Murray J, Furuyashiki M, Zhang S, Coan D, et al. Multiple mechanisms for exogenous heparin modulation of vascular endothelial growth factor activity. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010;111(2):461-468.

Xian W, Schwertfeger KL, Vargo-Gogola T, Rosen JM. Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *The Journal of Cell Biology*. 2005;171(4):663-673.

Yang F, Strand DW, Rowley DR. Fibroblast growth factor-2 mediates transforming growth factor-beta action in prostate cancer reactive stroma. *Oncogene*. 2008; 27(4):450-459.

Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Molecular Cancer Research*. 2010;8(5):629-642.

Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular research*. 2001;49(3):568.

Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual Review of Medicine*. 1998;49:407-424.

Zhang J, Alcaide P, Liu L, Sun J, He A, Luscinskas FW, Shi GP. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PloS One*. 2011;6(1):e14525.