



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UM CONDROITIM
SULFATO ISOLADO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*:
ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELO DE MELANOMA
MURINO**

NATAL

2019

LAIS CRISTINA GUSMÃO FERREIRA PALHARES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UM CONDROITIM
SULFATO ISOLADO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*:
ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELO DE MELANOMA
MURINO**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Dr^a. Suely Ferreira Chavante

Co-orientador: Dr^a. Adriana da Silva Brito

Co-orientador: Dr. Edwin Alexander Yates

NATAL

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Palhares, Lais Cristina Gusmão Ferreira.

Caracterização estrutural de um condroitim sulfato isolado do camarão *Litopenaeus vannamei*: atividade antitumoral em modelo de melanoma murino / Lais Cristina Gusmão Ferreira Palhares. - 2020.

168 f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Natal, RN, 2020.

Orientadora: Profa. Dra. Suely Ferreira Chavante.

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana da Silva Brito.

Elaborado por Ana Cristina Cavalcanti Tinóco - CRB-15/262

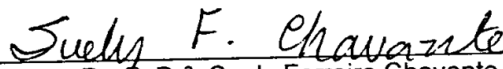
LAIS CRISTINA GUSMÃO FERREIRA PALHARES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UM CONDROITIM
SULFATO ISOLADO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*:
ATIVIDADE ANTITUMORAL EM MODELO DE MELANOMA
MURINO**

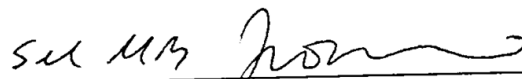
Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: 12/12/2019

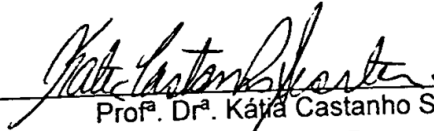
BANCA EXAMINADORA



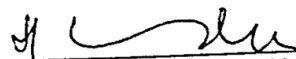
Prof.^a. Dr.^a. Suely Ferreira Chavante
Orientadora – UFRN



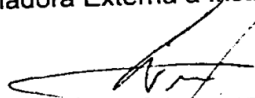
Prof.^a. Dr.^a. Selma Maria Bezerra Jerônimo
Examinadora Interna ao Programa - UFRN



Prof.^a. Dr.^a. Kátia Castanho Scortecci
Examinadora Interna ao Programa – UFRN



Prof.^a. Dr.^a. Helena Bonciani Nader
Examinadora Externa à Instituição – UNIFESP



Prof. Dr. Ivame Luis dos Santos Tersariol
Examinador Externo à Instituição – UNIFESP

Dedico esta obra

À minha mãe, **Sônia** (*in memoriam*) por ter me criado com a coragem para enfrentar o mundo e a vontade de sempre procurar ir além. Aonde estiver, saiba que esta conquista também é sua.

Ao meu pai, **Raimundo** por ter acreditado em mim incontestavelmente e pelo apoio massivo em todas as minhas decisões. Se não fosse pelo senhor, jamais teria chegado até aqui.

À minha avó, **Thereza** (*in memoriam*), por sempre ter me incentivado a estudar desde pequena e a procurar ser sempre melhor. Gostaria que tivesse acompanhado minha trajetória e a realização de um sonho que foi inspirado pela senhora.

À minha querida prima **Amanda**, ao meu afilhado **Leonardo** e à toda a minha **família** que sempre torceram e vibraram com cada conquista minha.

Dedico esta obra

Ao meu maior exemplo, a minha orientadora **Suely Ferreira Chavante** por toda a paciência, investimento e apoio nesses dez anos de pesquisa. Tudo o que eu sei hoje, eu devo à senhora. Obrigada por ter acreditado em mim e por ter abraçado minhas ideias. Com a senhora aprendi a amar a pesquisa. Obrigada também por ter sido mãe em alguns momentos, não há palavras para descrever toda a minha gratidão aqui pela senhora.

À minha querida (quase irmã) co-orientadora, **Adriana da Silva Brito** por toda forma de apoio, pelos ensinamentos e pelos momentos de diversão entre as horas de trabalho. Obrigada por ter acompanhado minha trajetória e por ter sempre se mostrado disponível para me ajudar.

To my Dear co-supervisor **Edwin Alexander Yates** , who welcomed me with open arms and did his best to give me the best experience as possible in his laboratory at the University of Liverpool. Thank you for the daily teachings, the pleasant conversations, and of course, for the 'cafezinhos' over the last year.

Agradecimentos

- ❖ To the gift that this PhD brought to me, my lovely boyfriend **Andy**, for being absent from his life for two months in order to join me at the end of this journey. Without you everything would have been arguably more difficult. I love you!
- ❖ Aos meus companheiros de laboratório **Jefferson Barbosa** e **Bárbara Freitas**, por terem me ajudado a realizar esse sonho. Jefferson, o trabalho na sala de cultivo de células teria sido mil vez mais tedioso. Obrigada pela paciência e por ter me mantido sempre alimentada. Bárbara, sem seu companheirismo e apoio, teria sido muito difícil realizar os experimentos *in vivo*. Obrigada pela amizade e carinho de sempre!
- ❖ Ao meus queridos amigos **Jefferson Duarte** (meu irmão), **Raphael Serquiz**, **Vinícius Campelo** e **Layssa Araújo** pelo apoio imprescindível de todas as horas. Vocês são jóias que Deus colocou em minha vida. Obrigada por tudo!
- ❖ Às minhas amigas **Vanessa Nascimento** e **Lívia Lima** por estarem sempre ao meu lado, nesses mais de 15 anos de amizade. Vocês me mostraram que a distância física não é párea para nós. Vocês são como irmãs para mim.
- ❖ Aos meus babies do laboratório, **Mirella**, **Matheus** e **Arlen**. Obrigada pela companhia diária e pela troca de ensinamentos. Espero que eu tenha sido capaz de ensinar algo a vocês.
- ❖ Ao professor **Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha** que me ajudou a realizar experimentos, cedendo matérias quando precisei e permitindo que eu usasse a estrutura do seu laboratório.
- ❖ À professora **Dra. Kátia Castanho Scortecci** pela colaboração com os experimentos de RT-qPCR, o que trouxe um grande enriquecimento para os meus resultados de doutorado. Obrigada por ter me deixado tão à vontade no seu laboratório.
- ❖ À **Thaís Carvalho** do Departamento de Morfologia da UFRN pelo lindo trabalho de histologia e imuno-histologia que tanto acrescentou ao meu doutorado.
- ❖ À banca de qualificação composta pelas professoras **Monique Alves**, **Vanessa Rachetti** e **Jailma Almeida**, por ter dado sugestões valiosas para o meu trabalho.
- ❖ Ao **programa de pós-graduação em Bioquímica** pelos recursos concedidos para que pudesse realizar esse trabalho.
- ❖ A todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente do **Departamento de Bioquímica** da UFRN: professores, funcionários e alunos. Obrigada pelos anos de convívio.

"Na vida não existe nada a temer, mas a entender."

Marie Curie.

RESUMO

Os Glicosaminoglicanos são polissacarídeos sulfatados capazes de interagir com uma vasta gama de moléculas bioativas, as quais atuam em importantes processos fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento tumoral. Dentre estas moléculas, a trombina, principal protease da coagulação é capaz de ativar inúmeras repostas celulares através da ativação do receptor ativador de protease 1 (PAR-1), que favorecem o desenvolvimento do câncer, como agregação plaquetária, proliferação, migração, expressão de oncogenes e metástase, além de atuar diretamente sobre a angiogênese, um dos eventos primordiais na biologia tumoral. Assim, uma vez que a trombina favorece de forma intrínseca a progressão tumoral através de PAR-1, biomoléculas capazes de inibir essa protease se tornam modelos interessantes na pesquisa do câncer. O presente trabalho descreve as características estruturais e o potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* de um condroitim sulfato isolado do cefalotórax do camarão *Litopenaeus vannamei* (sCS), o qual apresenta atividade anti-IIa. O composto foi obtido após proteólise, tratamento com acetona e purificação por cromatografias de troca-iônica e gel filtração. O sCS apresentou uma massa molecular média de 12 kDa e as análises por degradação enzimática e RMN revelaram que o composto apresenta resíduos únicos de GlcA 3-O-sulfato, além de GalNAc 4-O-sulfato, GalNAc 6-O-sulfato, e resíduos de GalNAc 4,6-di-O-sulfato. Semelhantemente à heparina, o sCS foi capaz de inibir atividades importantes para a progressão tumoral. Foi demonstrado que o sCS reduz 66% da migração de células de melanoma murino (B16F10) no ensaio da fenda e 70% através do *transwell*. Embora tenha sido incapaz de inibir a proliferação dessas células durante um período de 24h ou induzir alterações sobre o ciclo celular e apoptose, a molécula em estudo apresentou um importante efeito antiproliferativo em longo prazo, reduzindo cerca de 75% da clonogenicidade das células tumorais na concentração de 100 µg/mL ($p < 0,001$), bem como a proliferação celular independente de ancoragem, um importante indicativo da malignidade do tumor. Esses resultados podem ser corroborados pela diminuição da expressão gênica *in vitro* mediada por esses GAGs de genes envolvidos no desenvolvimento do melanoma, como Cx-43, MAPK, RhoA, PAFR, NFKB1 e VEGFA. O composto do camarão inibiu ainda *in vitro*, moléculas cruciais para a agressividade do tumor como a melanina e o TNF- α em 52% e 75%, respectivamente. Esses resultados podem explicar a significativa redução do crescimento tumoral do melanoma (89% de redução) e a diminuição dos níveis plasmáticos de IL-1 β , TNF- α e VEGF (32%, 65% e 88% de inibição, respectivamente) em camundongos tratados com 300 µg/Kg/dia de sCS. Adicionalmente, o sCS e heparina reduziram *in vivo*, os níveis de mRNA de todos os genes avaliados, inclusive PAR-1, bem como a marcação de imunohistoquímica para PAR-1 e VEGF em amostras de tumor e pulmão. Os dados aqui exibidos apontam o sCS como um modelo biotecnológico de potencial para o desenvolvimento de novas moléculas capazes de atuar na terapia oncológica à nível molecular.

Palavras-chave: Glicosaminoglicano. Câncer. Trombina.

ABSTRACT

Glycosaminoglycans are sulfated polysaccharides capable of interacting with a wide range of bioactive molecules, which act in important physiological and pathological processes, including tumor development. Among these molecules, thrombin, the main coagulation protease, is capable of activating countless cellular responses through activation of the protease activating receptor 1 (PAR-1) that favour the cancer development, such as platelet aggregation, proliferation, migration, oncogene expression and metastasis, as well as acting directly on angiogenesis, one of the primordial events in tumour biology. Thus, since thrombin intrinsically enables tumour progression through PAR-1, biomolecules capable of inhibiting this protease become interesting models in cancer research. The present work describes the structural characteristics and *in vitro* and *in vivo* antitumour potentials of a chondroitin sulfate isolated from the *Litopenaeus vannamei* shrimp cephalothorax (sCS). The compound was obtained after proteolysis, acetone treatment and purification by ion-exchange chromatography and desalted using gel filtration. sCS presented a 12KDa average molecular mass and analysis by enzymatic degradation and NMR revealed that the compound shows the unique GlcA 3-O-sulfate residue, as well as GalNAc 4-O-sulfate, GalNAc 6-O-sulfate and GalNAc 4,6-di-O-sulfate residues. Similar to heparin, sCS was able to inhibit important activities for tumour progression. sCS reduced 66% of murine melanoma (B16F10) cell migration in the wound healing assay and 70% when analyzed by the *transwell* assay. Although the shrimp compound was unable to inhibit cell proliferation or to induce apoptosis and/or cell death after 24h incubation, it showed an important long-term antiproliferative effect, reducing the tumour cell clonogenicity by 75% at 100 µg/mL concentration ($p < 0.001$), as well as inhibiting the anchorage-independent cell proliferation, an important indicator of tumour malignancy. These results may be inferred by the inhibitory effect presented by these GAGs on the *in vitro* gene expression of genes related to melanoma development, such as Cx-43, MAPK, RhoA, PAFR, NFKB1 and VEGFA gene. sCS compound also inhibited, *in vitro*, crucial molecules for tumour aggressiveness such as melanin and TNF- α by 52% and 75%, respectively. These results may explain the significant reduction in melanoma tumour growth (89% reduction) and the decrease of IL-1 β , TNF- α and VEGF plasma levels (32%, 65% and 88% inhibition, respectively) in mice treated with 300 µg/kg/day of sCS. Additionally, sCS and heparin reduced *in vivo* mRNA levels of all evaluated genes, including PAR-1, as well as the immunohistochemical labelling for PAR-1 and VEGF in tumour and lung samples. The data shown here point to sCS as a potential biotechnological model for the development of new molecules which may be used in cancer therapy at the molecular level.

keywords: Glycosaminoglycan. Cancer. Thrombin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Estrutura dos diferentes tipos de CS.....	24
Figura 02	Esquema da biossíntese clássica para CS.....	26
Figura 03	Estrutura da trombina e a ativação de PAR-1 e suas repostas celulares.....	31
Figura 04	Regulação de PAR-1 no melanoma e a sinalização de moléculas envolvidas na progressão do melanoma.....	41
Figura 05	A análise por cromatografia de troca aniônica HPLC dos dissacarídeos formados após digestão do CS de camarão pelas condroitinases ACII e ABC.....	63
Figura 06	Espectro de RMN ¹ H/ ¹³ C HSQC do sCS com projeções externas 1-dimensional ¹ H e ¹ D ¹³ C obtidas à 600MHz em D ₂ O à 343K e referidas à 100µM DSS.....	66
Figura 07	Espectros sobrepostos de HSQC, HMBC e espectro de TOCSY, amostrando as conexões presentes dentre os resíduos de N-Acetilgalactosamina.....	67
Figura 08	Espectros sobrepostos de HSQC, HMBC e espectro de TOCSY, mostrando as conexões presentes dentre os resíduos de ácido glucurônico.....	68
Figura 09	Espectros sobrepostos de HSQC, HMBC e espectro de TOCSY, mostrando as conexões presentes entre os resíduos de ácido glucurônico e N-Acetilgalactosamina.....	69
Figura 10	Avaliação do efeito do sCS sobre a viabilidade células de melanoma.....	70
Figura 11	Efeito do sCS e heparina sobre a indução de apoptose e sobre o ciclo celular de células B16F10 da heparina e do sCS.....	71
Figura 12	Efeito do sCS e heparina na migração de células tumorais B16F10 no ensaio da fenda (<i>wound healing assay</i>).....	73
Figura 13	Efeito do sCS e heparina na migração de células tumorais B16F10 em ensaio transwell.....	74
Figura 14	Efeito do sCS e heparina sobre a capacidade de formação de colônia (clonogenicidade) de células B16F10.....	76
Figura 15	Efeito do sCS sobre a capacidade de proliferação independente de ancoragem das células B16F10.....	77
Figura 16	Efeito do sCS e heparina na expressão de genes relacionados ao melanoma em células de melanoma B16F10.....	79
Figura 17	Efeito do sCS e heparina sobre a produção de melanina pelas células de melanoma B16F10.....	80
Figura 18	Efeito do sCS e da heparina na produção de níveis de TNF-α secretados pelas células B16F10.....	81
Figura 19	Inibição do crescimento tumoral <i>in vivo</i> pelo sCS e heparina.....	83
Figura 20	Efeito do sCS e heparina na expressão de genes relacionados ao melanoma em tumores murinos de melanoma.....	86

Figura 21	Efeito do sCS e heparina na expressão de genes relacionados ao melanoma em secções de pulmões de camundongos C57bl/6 com melanoma induzido por células B16F10.....	87
Figura 22	Efeito do sCS e heparina na produção de níveis de TNF- α e IL-1 β no plasma dos animais submetidos ao ensaio de crescimento tumoral.....	88
Figura 23	Efeito do sCS e heparina sobre os níveis de VEGF no plasma dos animais submetidos ao ensaio de crescimento tumoral.....	89
Figura 24	Fotomicrografias representativas da análise histológica de fragmentos de tumores de camundongos C57bl/6 induzidos com células de melanoma B16F10.....	91
Figura 25	Fotomicrografias representativas da análise histológica de fragmentos de pulmões de camundongos C57bl/ induzidos com células de melanoma B16F10.....	92
Figura 26	Fotomicrografias representativas da análise imuno-histoquímica para PAR-1 e VEGF de fragmentos de tumores de camundongos C57bl/6 induzidos com células de melanoma B16F10.....	93
Figura 27	Fotomicrografias representativas da análise imuno-histoquímica para PAR-1 e VEGF de fragmentos de pulmões de camundongos C57bl/6 sem indução tumoral (controle negativo) e induzidos com células de melanoma B16F10.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes relacionados ao desenvolvimento do melanoma avaliados.....	56
Tabela 2	Rendimento das frações obtidas a partir da F-3,0M após fracionamento com acetona.....	61
Tabela 3	Atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C do espectro de RMN HSQC para sCS obtido de <i>Litopenaeus vannamei</i> (Valores em ppm à 70 °C).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-2α	Fator transcricional AP-2-alpha
AT	Antitrombina
CETAVLON	Brometo de cetiltrimetilamônio
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CS	Condroitim sulfato
CS-4	Condroitim 4-sulfato
CS-6	Condroitim 6-sulfato
Cx-43	Do inglês " <i>Connexin-43</i> "
D₂O	Água deuterada
DEAE	Dietilaminoetil
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DS	Dermatam sulfato
EDA	1,2-diaminoetano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
ERK	Do inglês " <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> "
F-0,5A	Fração obtida após precipitação com acetona na proporção 0,5:1
F-0,7A	Fração obtida após precipitação com acetona na proporção 0,7:1
F-1,0A	Fração obtida após precipitação com acetona na proporção 1:1
F-3,0 M	Fração 3,0 molar após complexação com resina de troca iônica
FT	Fator tecidual

FvW	Fator de von Willebrand
GlcA	Ácido glucurônico
GAGs	Glicosaminoglicanos
GalNAc	N-acetil-glicosamina
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HCII	Cofator II da heparina
Hep	Heparina de mamíferos
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HS	Heparam sulfato
HSQC	Coerência quântica única heteronuclear
I	Ácido idurônico não-sulfatado
I₂s	Ácido idurônico 2-sulfato
IL-1β	Interleucina 1-beta
IL-8	Interleucina 8
MAPK	Do inglês " <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> "
MASPIN	Do inglês " <i>mammary serine protease inhibitor</i> "
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	Do inglês " <i>Messenger ribonucleic acid</i> "
NF-$\kappa\beta$	Do inglês " <i>Nuclear factor kappa beta</i> "
NS	Domínio N-sulfatado
PBS	Tampão fosfato salino
PAF	Do inglês " <i>Platelet activator factor</i> "
PAFR	Do inglês " <i>Platelet activator factor receptor</i> "

PAR-1	Do inglês " <i>Protease-activated receptor</i> "
PDA	1,3-diaminopropano acetato
PGCS	Proteoglicano de CS
TP	Tempo de protrombina
QS	Queratam sulfato
RhoA	Do inglês " <i>Ras homolog family member A</i> "
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RT-PCR	Do inglês " <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> "
sCS	Shrimp Chondroitin sulfate
SFB	Soro fetal bovino
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSP	Ácido propanoico trimetilsilil
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
VEGF	Do inglês " <i>Vascular endothelial growth factor</i> "
VEGFA	Do inglês " <i>Vascular endothelial growth factor A</i> "

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Condroitim Sulfato.....	22
1.2. A trombina e o seu papel na ativação de PAR-1.....	28
1.3. A sinalização na biologia tumoral do melanoma.....	31
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Materiais Biológicos.....	44
3.1.1. Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	44
3.1.2. Animais.....	44
3.1.3. Linhagens celulares.....	44
3.2. Reagentes.....	45
3.3. Aparelhos.....	46
3.4. Extração dos glicosaminoglicanos a partir do cefalotórax de <i>Litopenaeus vannamei</i>	47
3.5. Eletroforese.....	48
3.6. Análise estrutural do composto tipo CS do camarão <i>L.</i> <i>vannamei</i>	48
3.6.1. Determinação do peso molecular.....	48
3.6.2. Digestão enzimática e análise por HPLC.....	48
3.6.3. Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	49
3.7. Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do sCS do camarão <i>L. vannamei</i>	49
3.7.1. Ensaio de viabilidade celular.....	50
3.7.2. Análise por citometria de fluxo.....	51
3.7.3. Ensaio clonogênico.....	52
3.7.4. Ensaio de proliferação celular independente de ancoragem.....	52
3.7.5. Ensaio de reparo da fenda (wound healing assay).....	53
3.7.6. Ensaio de migração celular (<i>transwell</i>).....	54
3.7.7. Quantificação do conteúdo de melanina.....	55
3.7.8. Análise da expressão gênica	56

3.7.8.1 Extração de RNA.....	57
3.7.8.2 Obtenção da biblioteca de cDNA.....	57
3.7.8.3 Quantificação da expressão de genes relacionados ao melanoma.....	57
3.7.9. Análise sobre o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	58
3.7.10. Quantificação de citocinas.....	58
3.7.11. Quantificação de VEGF	58
3.7.12. Análise histológica dos tumores e pulmões de camundongos.....	59
3.7.13. Marcação de PAR-1 e VEGF por imuno-histoquímica dos tumores e pulmões de camundongos.....	59
3.8. Análise estatística.....	60
4. RESULTADOS	61
4.1. Purificação do composto tipo CS a partir do camarão <i>L. vannamei</i>	61
4.2. Caracterização estrutural.....	62
4.2.1. Determinação da massa molecular e da composição dissacarídica do CS de <i>L. vannamei</i>	62
4.2.2. Determinação da composição monossacarídica do CS de <i>L. vannamei</i>	64
4.3. Avaliação do efeito anti-melanoma <i>in vitro</i> do sCS.....	71
4.3.1. Efeito do cCS sobre a viabilidade, ciclo celular e apoptose de células de melanoma B16F10.....	71
4.3.2. Efeito do sCS sobre a migração de células de melanoma B16F10.....	73
4.3.3. Efeito do sCS sobre a clonogenicidade das células de melanoma B16F10.....	74
4.3.4. Efeito do sCS sobre a proliferação independente de ancoragem das células de melanoma B16F10.....	75
4.3.5 Efeito do sCS na expressão de genes relacionados ao melanoma pelas células B16F10.....	78
4.3.6 Efeito do sCS na produção de melanina pelas células de melanoma B16F10.....	81
4.3.7 Efeito do sCS na produção de TNF- α pelas células de melanoma B16F10	82

4.4. Avaliação do efeito anti-melanoma <i>in vivo</i> do sCS.....	83
4.4.1 Efeito do sCS sobre o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	83
4.4.2 Efeito do sCS na expressão de genes relacionados ao melanoma <i>in vivo</i>	84
4.4.3 Efeito do sCS sobre a secreção de citocinas e VEGF durante o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	89
4.4.4 Efeito do sCS sobre a histologia e expressão tecidual de PAR-1 e VEGF durante o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	90
5. DISCUSSÃO	97
6. CONCLUSÕES	130
7. REFERÊNCIAS	132
8. ANEXOS	159



INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A biologia tumoral depende da ativação de uma complexa rede de sinalização, na qual uma grande variedade de moléculas participam. Dentre estas, destacam-se os polissacarídeos do tipo glicosaminoglicanos (GAGs). A interação desses polímeros com diversos fatores, receptores e citocinas está intrinsicamente envolvida no crescimento, progressão e metástase tumoral (AFRATIS et. al., 2012). Os GAGs estão envolvidos na múltipla sinalização de cascatas necessárias para angiogênese, invasão e metástase no câncer. A interação e o papel que essas moléculas desempenham em vários tipos de câncer levaram ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas e novos medicamentos na terapia do câncer (VOLPI, 2006). Ao longo dos anos diversos estudos demonstraram o papel de GAGs na inibição da progressão tumoral. A heparina por exemplo, além de suas propriedades anticoagulantes, também possui propriedades antitumorais (BORSIG, 2010; BOCHENEK, PÜSKÜLLÜOGLU & KRZEMIENIECK, 2013). No entanto, seu potencial anticoagulante exacerbado limita seu desenvolvimento como um agente antitumoral e por isso, moléculas análogas com efeito anticoagulante reduzido ou ausente, porém com potenciais biológicos contra o câncer, têm sido alvo de estudo (LOKWANI et. al., 2014). Nesse sentido, devido à sua grande heterogeneidade estrutural, GAGs do tipo Condroitim sulfato (CS) têm sido amplamente investigados pelos seus potenciais antitumorais em diversos tipos de canceres, incluindo tumores agressivos com alta taxa de metástase, como o melanoma (ZHAO et. al., 2013).

Durante o desenvolvimento tumoral, distúrbios na biologia vascular são frequentemente ocasionados e por isso, o sistema hemostático e a resposta inflamatória são frequentemente ativados. Praticamente todos os tipos de células tumorais são capazes de ativar o processo de coagulação criando o estado de hipercoagulabilidade característico do câncer. Isso ocorre porque as células neoplásicas passam a expressar em sua superfície moléculas pró-coagulantes, especialmente o fator tecidual (FT). Células endoteliais, monócitos ou macrófagos também podem ser induzidos a expressar FT por ação de citocinas inflamatórias, como a interleucina-1 β e o fator de necrose tumoral- α (IL-1 β e TNF- α) produzidos pelo tumor (PICCIOLI & PRANDONI, 2001; PRANDONI, FALANGA & PICCIOLI, 2005; ÜNLÜ & VERSTEEG, 2014), tornando estes eventos totalmente interligados. O FT representa o principal desencadeador da coagulação e sua presença no

microambiente tumoral permite a formação do complexo tenase extrínseco e, conseqüentemente, a ativação do FXa e a geração de trombina. Além de aumentar os riscos de tromboembolismo venoso no paciente oncológico, a ativação de trombina favorece a progressão e agressividade do tumor, além de favorecer a resposta inflamatória (DONATI & FALANGA, 2001; LEE, 2003; DE CICCIO 2004). Isso ocorre porque essas moléculas atuam como indutoras de importantes eventos da carcinogênese e do processo inflamatório. (FALANGA, MARCHETTI, VIGNOLI, 2013; NIERODZIK, KARPATKIN, 2006; WANG et al., 2010).

Essas respostas celulares são mediadas pela trombina através da ativação de receptores ativadores de proteases (PAR) (CHU, et. al., 2005). Receptores tipo PAR são receptores acoplados à proteína G que possuem um mecanismo capaz de converter um evento de clivagem proteolítica extracelular em um sinal transmembrana, modulando assim respostas celular (RASMUSSEN et. al., 1991; VU et. al., 1991). A ativação de receptores PAR pela trombina, em particular o PAR-1, está relacionada com a expressão de uma variedade de moléculas fisiopatológicas, tais como, interleucinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e fatores angiogênicos (TELLEZ & BAR-ELI, 2003; TAYLOR et al, 2006; ZIGLE et. al., 2011; QUEIROZ et. al., 2014). As atividades pró-tumorais da trombina incluem, alterações essenciais na fisiologia celular, tais como autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos estímulos anti-crescimento, resistência a apoptose e potencial ilimitado de replicação celular. Além disso, a trombina se mostra capaz de agir diretamente sobre a angiogênese, um dos principais processos para a sobrevivência do tumor (NIERODZIK e KARPATKIN, 2006).

Assim, uma vez que mecanismos da coagulação e da inflamação são frequentemente ativados no câncer, a trombina desempenha um papel central como uma molécula intercessora destes eventos fisiopatológicos (MOLNAR et. al., 2007) e por conseguinte, biomoléculas capazes de inibi-la se tornam modelos interessantes para o tratamento do câncer e da inflamação, com efeitos diretos sobre a tumorigênese e suas complicações como o estado de hipercoagulabilidade e a angiogênese. Nesse contexto, condroitim sulfatos obtidos de diversas fontes animais vêm sendo alvos de estudos biotecnológicos devido sua capacidade de inibir a trombina (BORSIG et. al., 2007; MOURÃO et. al., 2001).

1.1 Condroitim sulfato

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são um grupo de polissacarídeos sulfatos encontrados exclusivamente em tecidos animais (SAMPAIO et al., 2006). Devido à sua capacidade de reconhecer e de se ligar a diferentes macromoléculas, estes compostos são capazes de modular processos biológicos importantes, apresentando grande potencial biotecnológico, colocando-os em evidência no campo da indústria farmacêutica (KIURU et al., 2014). Estruturalmente, os GAGs são heteropolissacarídeos lineares, carregados negativamente formados por unidades dissacarídicas repetidas, onde se alternam uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) e um resíduo de ácido urônico (β -D-glucurônico ou α -L-idurônico) ou um açúcar neutro (D-galactose). As diferentes combinações desses resíduos dão origem aos seguintes GAGs: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), ácido hialurônico (AH), queratam sulfato (QS), heparina (Hep) e heparam sulfato (HS). O QS não apresenta ácido urônico e contém galactose em sua sequência dissacarídica, enquanto AH carece de sulfatação em suas cadeias. Dentre esses, a Hep e HS são os GAGs mais bem elucidados na literatura, onde as mais variadas atividades biológicas foram reportadas para esses compostos (BRITO et al., 2014; 2018; CHAVANTE et al., 2014; DIETRICH et al., 1985; LIMA et al., 2013; NADER et al., 1984; TRINDADE et al., 2008), incluindo o efeito antitumoral.

Estudos mostram que a heparina é capaz de inibir a sinalização induzida por fatores mitogênicos em células tumorais, impedindo a proliferação e a migração celular (NIKITOVIC et al., 2014). Também tem sido demonstrado que esse GAG bloqueia as interações envolvendo plaquetas, células tumorais e endotélio que são mediadas pelas selectinas, dificultando o processo de sobrevivência, migração celular e metástase pelas células tumorais (NIERS et al., 2007). Além disso, dados mostram que a heparina modula a angiogênese *in vitro* bloqueando a interação entre FGF e HS (DREYFUSS et al., 2010; LOKWANI et al., 2014). Esses dados evidenciam que a terapia anticoagulante com a Hep traz para o paciente oncológico vantagens que vão além da redução do risco de tromboembolismo venoso, como a modulação de processos pró-tumorais. Entretanto, o aproveitamento de seu potencial antitumoral é limitado por complicações hemorrágicas que acompanham sua utilização terapêutica (ALBAN, 2011). Por essa razão, tem se despertado a

busca por fontes alternativas para obtenção de novos GAGs que apresentem efeitos colaterais reduzidos, mas que preservem as propriedades biotecnológicas.

A identificação desses compostos das mais variadas origens animais, têm-se tornado frequente, com um destaque especial para compostos obtidos a partir de invertebrados marinhos. As condições adversas encontradas no ambiente marinho, como alta salinidade e variações de temperatura e pressão, propiciou uma evolução peculiar, fazendo com que ao longo de milhões de anos de evolução esses animais desenvolvessem GAGs com características estruturais únicas, envolvidas em processos bioquímicos necessários para a adaptação às condições ambientais extremas (DATTA, TALAPATRA, SWARNAKAR, 2015). Nader e colaboradores mostraram que glicocisaminoglicanos sulfatados como HS e CS estão presentes em maior quantidade em tecidos de animais que vivem em habitat com alta salinidade, quando comparado à espécies que habitam ambientes com baixo teor de sal. Esses compostos parecem ainda exibir um maior conteúdo de sulfatação em função do grau de sanilidade (NADER et.al., 1983). Dentre esse polissacarídeos sulfatados, diversas moléculas de CS foram caracterizadas a partir de fontes naturais, demonstrando uma grande diversidade estrutural e participação em vários eventos biológicos (BORSIG et. al., 2007; DEEPA et. al. 2007; NADER et. al., 1983; SHETTY et.al. 2009; TOIDA et. al. 2015).

Atualmente, as estruturas de CS naturais relatadas são classificadas de acordo com seus padrões de sulfatação de seus resíduos de ácido glucorônico (GlcA) e N-acetilglicosamina (GalNAc). Sob esse sistema de nomenclatura, os resíduos GalNAc sulfatados nas posições C-4 e/ou C-6 dão origem às unidades do tipo CS-A (GlcA-GalNAc 4-O-sulfato), CS-C (GlcA-GalNAc 6-O-sulfato) e CS-E (GlcA-GalNAc 4,6-di-O-sulfato). Os resíduos de GlcA exibem O-sulfatação em C-2 e mais raramente em C-3, dando origem às unidades de CS-D (GlcA 2-O-sulfato-GalNAc 6-O-sulfato), CS-K (GlcA 3-O-sulfato -GalNAc 4-O-sulfato) e CS-S (GlcA 2,3 di-O-sulfato-GalNAc 4 ou 6-O-sulfato), respectivamente (CAVALCANTE et al., 2018; NANDINI & SUGAHARA, 2006; PAVÃO, VILELA-SILVA & MOURÃO 2006; VOLPI 2006) (Fig. 1). Além disso, a presença de ramos de fucose sulfatada em resíduos de GlcA é comum nas estruturas de CS obtidos de fontes naturais (KALE et al., 2013; MOU et al., 2018). Deve-se enfatizar, no entanto, que CS isolados de invertebrados marinhos geralmente apresentam uma estrutura com padrão de sulfatação

incomum, dificultando sua classificação dentro do sistema de nomenclatura convencional para os condroitim sulfatos. Isso ocorre devido a uma grande heterogeneidade da estrutura apresentada pelo CS, cujas cadeias podem conter secções que correspondem a diferentes combinações dos supostos tipos de CS.

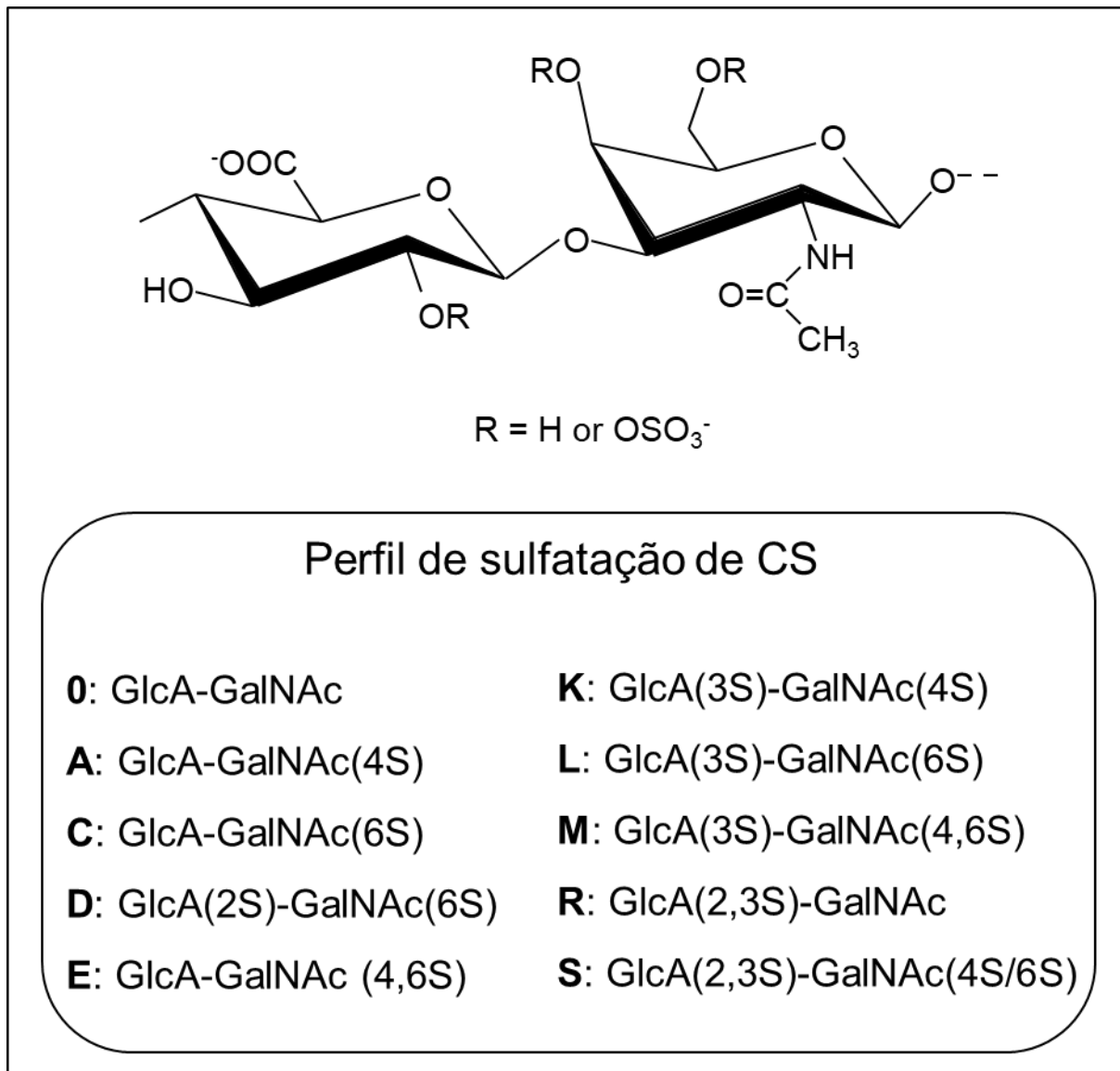


Figura 1. Estrutura dos diferentes tipos de CS. A combinação de diferentes padrões de sulfatação dos resíduos de ácido glucurônico e N-acetil-galactosamina dão origem às cadeias distintas de CS.

A biossíntese de CS é controlada através de múltiplas enzimas, as quais parecem exibir padrões específicos de expressão dependente do tipo de organismo. A construção das cadeias de CS ocorre no retículo endoplasmático/Golgi e é iniciada através da síntese da região de ligação ao GAG, GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-

4Xyl β 1-O-Ser, o qual está covalentemente ligado aos resíduos de serina incorporados em diferentes proteínas do núcleo (SUGAHARA & KITAGAWA, 2003). A estrutura do tetrassacarídeo da região de ligação é montada através da adição sequencial de unidades individuais de monossacarídeos, xilose, dois resíduos sucessivos de galactose e um único resíduo de GlcA, pelas enzimas glicosiltransferases específicas correspondentes, XylT (xilossiltransferase), GalT-I (β 1,4-galactossiltransferase-I), GalT-II (β 1,3-galactossiltransferase-II) e GlcAT-I (β 1,3-glucuroniltransferase-I), respectivamente (ALMEIDA et. al., 1999; BAI et. al., 2001; GÖTTING, KUHN & KLEESIEK, 2007; WEI et. al. 1999). Em seguida, a primeira transferência do resíduo de GalNAc para a região terminal não-redutora do resíduo de GlcA na região de ligação do tetrassacarídeo por GalNAcT-I (GalNAc transferase-I) desencadeia a síntese da estrutura de CS. A repetição dissacarídica característica das cadeias de CS é então sintetizada pelas adições alternadas dos resíduos de GlcA e GalNAc, através das ações de GlcAT-II (GlcA transferase-II) e GalNAcT-II (GalNAc transferase-II), respectivamente (SUGAHARA & KITAGAWA, 2003; UYAMA, KITAGAWA & SUGAHARA, 2007) (Fig. 2). Uma vez formada, a cadeia de CS pode ser modificada por sulfatação e epimerização, dando origem às mais diversas estruturas. Grupos sulfato são adicionados por múltiplas sulfotransferases, em várias posições, principalmente nas posições do C-2 de GlcA e nas posições C-4 e/ou C-6 dos resíduos de GalNAc (MALMSTRÖM et. al., 2012). Contudo, sulfatação na posição C-3 de GlcA ou ambos C-2 e/ou C-3 de GlcA, podem ocorrer de forma rara em algumas espécies de animais (CAVALCANTE et. al., 2018; PALHARES et. al., 2019; SUGAHARA et. al., 1996).

As características estruturais peculiares desses compostos distinguem o processo biossintético do modelo clássico de biossíntese de GAG, sugerindo uma relação entre o padrão de sulfatação de GAG e a evolução animal. Ainda não é claro qual foi o primeiro organismo a sintetizar moléculas do tipo CS, contudo, a presença desse GAG foi verificada já em invertebrados do filo Platyhelminthes com cadeias compostas principalmente por unidades dissacarídicas contendo GalNAc-4-O-sulfato, seguidas por unidades contendo GalNAc 6-O-sulfato e não-sulfatadas (YAMADA, SUGAHARA & OZBEK, 2011). Cadeias de CS supersulfatadas parecem ter surgido apenas a partir do filo Echinodermata (BORSIG et. al., 2007; SHETTY et. al., 2009), enquanto que a presença da rara 3-O-sulfatação em GlcA parece ser

mais frequente em crustáceos (PALHARES et. al., 2019; CAVALCANTE et. al., 2018; SUGAHARA et. al., 1996). Esse padrão de sulfatação em GAGs pode variar também de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário animal. Uma substituição gradativa de resíduos de GalNAc não sulfatados para resíduos de GalNAc 4-O-sulfatados é observada a medida que os tecidos embrionários se desenvolvem no molusco *Pomacea* sp. (JERONIMO, DIETRICH & NADER, 1989), sugerindo que a biossíntese de GAGs é direcionada em cada etapa da ontogênese por diferentes enzimas.

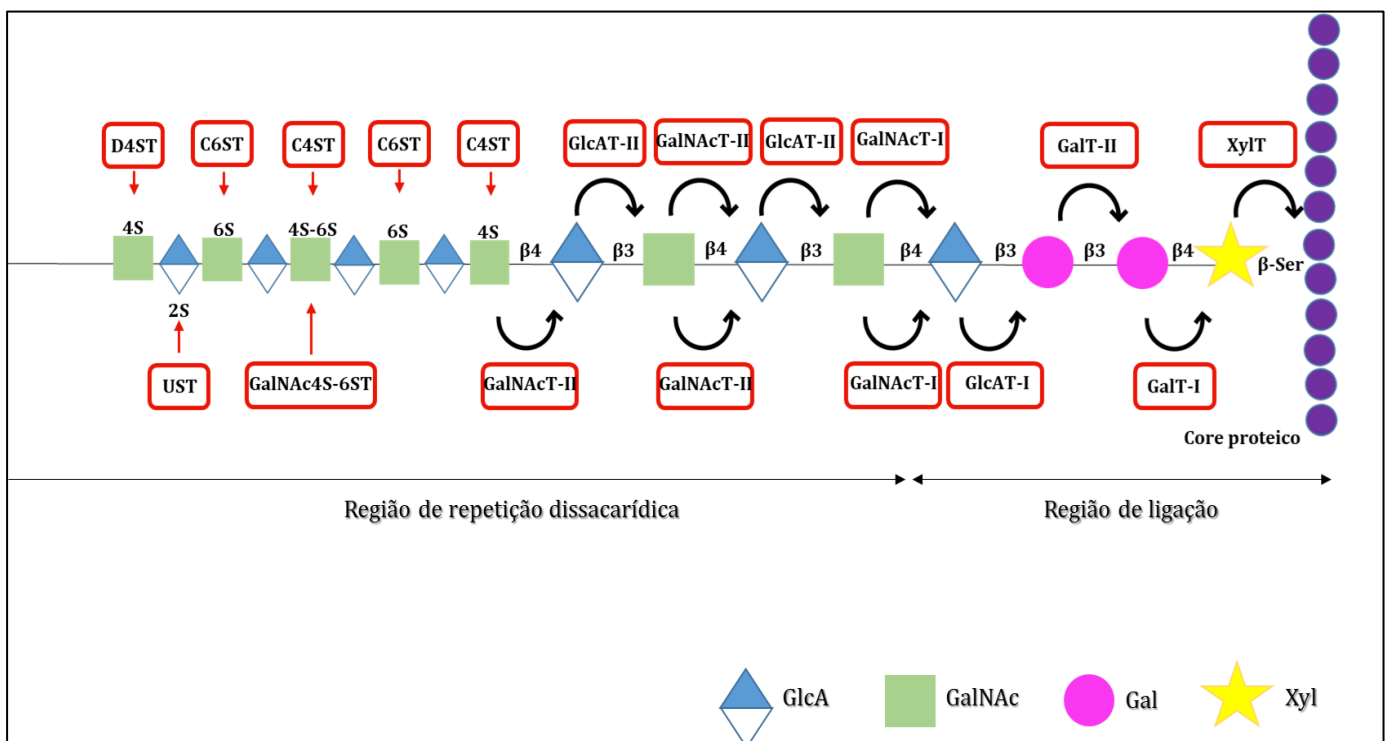


Figura 2. Esquema da biossíntese clássica para CS. Várias glicosiltransferases participam da síntese da região de ligação do tetrassacarídeo e da região de repetição dissacarídica. XylT, xilosiltransferase; GalT-I, β1,4-galactosiltransferase-I; GalT-II, β1,3-galactosiltransferase-II; GlcAT-I, β1,3-glucuroniltransferase-I; GalNAcT-I, GalNAc transferase-I; GlcAT-II, GlcA transferase-II; GalNAcT-II, GalNAc transferase-II; C4ST, condroitim 4-O-sulfotransferase; C6ST, condroitim 6-O-sulfotransferase; UST, uronil 2-O-sulfotransferase; GalNAc4S-6ST, GalNAc 4-sulfate 6-O-sulfotransferase. (Adaptada de MIKAMI & NITAGAWA, 2013).

Uma vez que cada enzima responsável pela biossíntese de cadeias de CS exibe padrão de expressão específico ao tipo de célula e é regulada espaço-temporalmente, há uma heterogeneidade significativa mesmo em cadeias de CS isoladas de uma única espécie, levando potencialmente à diversidade funcional de proteoglicanos de CS (CSPG). GAGs sulfatados estão ligados covalentemente às

proteínas para formar vários proteoglicanos que participam de vários fenômenos fisiológicos. (IOZZO & SCHAEFER 2015; USTYUZHANINA et. al., 2018; VOLPI, 2011). A variedade na posição e grau das sequências de sulfatação, tamanho, número e dissacarídeos inseridos nos CSPGs fazem do CS uma molécula heterogênea. Os numerosos efeitos reportados para o CS incluem a modulação de respostas biológicas como a proliferação celular, diferenciação, migração, morfogênese tecidual, reparo de feridas, inflamação, trombose e atividades antitumorais (KRICHEN et al., 2018; LIU et. al., 2016; MOU et al. 2018; PALHARES et. al., 2019; STOCK, JUNGSMANN & SEIDLER, 2011; SUGAHARA et al., 2003).

Fundamentalmente, as diferenças na estrutura das cadeias de CS levam a propriedades biológicas e farmacológicas distintas. Ao contrário da heparina e de seus miméticos, que são capazes de se ligar ao HCII e à antitrombina para inibir proteases, a atividade anticoagulante do CS geralmente se dá através da inibição direta e mediada pelo HCII da trombina (CASU, GUERRINI, & TORRI, 2004). Embora alguns estudos descrevam que o grau de fucosilação é uma característica importante para a atividade inibitória da trombina mediada por HCII de compostos tipo CS (XU et al., 2018), ou ainda que a presença de dissacarídeos monossulfatados nas posições 6 e 4 da N-acetil β -D-galactosamina sejam implicantes no potencial anticoagulante para moléculas de CS (PAVÃO et. al., 1998), estudos recentes mostram dados que sugerem que a relação entre padrões estruturais específicos e atividades biológicas não seja tão estreita (KRICHEN et. al., 2018; PALHARES et. al., 2019). Assim, as propriedades biológicas das moléculas de CS parecem apresentar complexas relações multifatoriais implicadas em seus diferentes mecanismos de ação. O mesmo ocorre para a atividade anti-inflamatória, frequentemente reportada para GAGs do tipo CS (CUNHA, AGUIAR, SILVA, & MICHELACCI, 2017; KRYLOV et. al., 2011; MOU et. al., 2018; USTYUZHANINA et. al., 2018). Embora a presença de ramos de fucose e um alto grau de sulfatação sejam frequentemente relatados como características estruturais essenciais para os efeitos anti-inflamatórios mais pronunciados de CS, a alta atividade de inibição inflamatória apresentada por um CS isolado de crustáceo sugere que existam outras características bioquímicas envolvidas nesse efeito (PALHARES et. al., 2019), como por exemplo a capacidade de se ligar e interagir com proteínas importantes que estão envolvidas nesse processo.

Várias moléculas de CS demonstram um interessante potencial em inibir a trombina, seja de forma direta ou através do cofator II da heparina (HCII). Essa protease, por sua vez, é capaz de induzir a expressão de uma variedade de moléculas biológicas mediadas por receptores do tipo PAR que modulam processos fisiológicos e patológicos, como inflamação e desenvolvimento de câncer, respectivamente (COUGHLIN, 2000; ZIGLER, KAMIYA, BRANTLEY, VILLARES, BARELI, 2011). Assim, a atividade anti-trombina de CS coloca esse GAG em destaque na pesquisa por novos compostos com aplicações biotecnológicas na oncologia. A ativação de enzimas da coagulação no microambiente tumoral desempenha um papel importante para a progressão do tumor, com efeitos diretos e indiretos da trombina sobre a biologia da agressividade tumoral. Os estudos na literatura do potencial antitumoral do CS ainda são escassos. Contudo, foi demonstrado que moléculas de CS são capazes de atuar bloqueando P-selectinas presentes em plaquetas, células endoteliais e tumorais, inibindo assim a metástase, além de modular a sinalização por NF- κ B e inibir a metástase de células de melanoma murino (BORSIG et. al., 2007; ZHAO et. al., 2013).

1.2 A trombina e o seu papel na ativação de PAR-1

A trombina é a principal protease efetora da coagulação, responsável pela ativação do fibrinogênio em fibrina que culmina na formação das redes de fibrina, as quais juntamente com as plaquetas constitui a base estrutural do coágulo. Essa serino-protease peculiar foi descoberta ainda no século 19 e pertence à família de quimiotripsinas, cuja estrutura permite o reconhecimento específico de um vasto número de substratos, colocando essa enzima como uma das moléculas biológicas mais multi-facetárias. A trombina desempenha duas funções opostas importantes: atua como um fator pró-coagulante quando converte fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel, em um local de lesão, e como anticoagulante através da ativação da proteína C. O coágulo de fibrina é estabilizado com a ativação do fator XIII (transglutaminase), inibição da fibrinólise pela ativação do inibidor da via do fator tecidual (TFPI) e pela ativação proteolítica dos fatores V, VIII e XI (TSOPANOGLOU & MARAGOUDAKIS, 2009). Por outro lado, a ligação da trombina à glicoproteína transmembrana trombomodulina (TM), expressa por células endoteliais, inibe sua capacidade de clivar o fibrinogênio (HOROWITZ et. al., 2011), além de ativar a proteína C. A proteína C ativada (APC), por sua vez, inativa os fatores de

coagulação Va, VIIIa, Xa e IXa, necessários para a geração de trombina. Finalmente, a trombina é bloqueada no sítio ativo e removida da circulação pelas serpinas circulantes, como a antitrombina (AT), e pelo cofator II da heparina (HCII) (HUNTINGTON, 2005).

A especificidade da trombina depende da competição entre três sítios: o sítio ativo e os exo-sítios I e II. As interações feitas através dos exo-sítios diretas ou dependentes de cofatores, como AT ou HCII, influenciam a formação dos complexos iniciais de trombina-substrato, permitindo a clivagem da ligação peptídica. O reconhecimento e clivagem do fibrinogênio pela trombina é por exemplo, mediado pelas interações do sítio ativo e do exo-sítio I, enquanto que a clivagem de receptores PAR-1 e 4 em plaquetas, é mediada através dos exo-sítios I e II, em uma região ácida que abrange os aminoácidos 51 a 63 (HUNTINGTON, 2005). Essa região altamente ácida, denominada local de ligação do tipo hirudina, é semelhante à sequência de aminoácidos do peptídeo anticoagulante originalmente obtido da sanguessuga *Hirudo medicinalis*, a hirudina (ARORA, RICKS & TREJO, 2007; BODE, 2006). Esse domínio é responsável pelo aumento da afinidade e potência da trombina com o PAR-1 (ARORA, RICKS & TREJO, 2007). PAR-1, por sua vez também contém um local de clivagem da trombina entre a arginina na posição 41 e a serina na posição 42. Essa interação com alta especificidade permite que a trombina clive a região N-terminal de PAR-1 de maneira irreversível, expondo o sítio ativo do receptor de protease por clivagem de um domínio extracelular chave (resíduos LDPR/S), formando assim uma nova porção amino-terminal com a Serina 42. Essa nova sequência exposta é usada como âncora, a qual se liga intramolecularmente ao resíduo 42SFLLRN47 na região conservada do segundo *loop* do receptor, induzindo assim a sinalização transmembranar (YUAN et. al., 2016).

Mais tarde, esse mecanismo de ativação de receptores PAR-1 pela trombina se tornou um alvo de estudo frequente. Dentre os receptores tipo PAR caracterizados até então, o PAR-1 é o principal receptor ativado pela trombina e o mais bem estudado, tendo sido identificado pela primeira vez por Vu e colaboradores em 1991 (VU et. al., 1991). Esse receptor de protease pertence à uma família de receptores que apresentam sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, que diferentemente das interações típicas de ligação que ocorrem neste grupo de proteínas, a ativação de PAR-1 se dá através da clivagem

proteolítica do domínio N-terminal do receptor pelas serino-proteases (Fig. 3). Embora a trombina seja o ativador mais eficaz e potente conhecido de PAR-1, a ativação pode ocorrer através de outros ligantes, como o fator Xa, tripsina, granzima A e plasmina (TRIVEDI et. al., 2009; YUAN et. al., 2016). PAR-1 também pode sofrer uma clivagem proteolítica e ser ativado pela metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1) em células tumorais (BOIRE et. al., 2005; RUF & MUELLER, 2006; O'BRIEN et. al., 2001). Uma vez ativado, o PAR-1 inicia uma cascata de sinalização através dos subtipos de proteína G ativados, G α q, G α i, G α 12,13 e G β γ , resultando na ativação de várias vias de transdução de sinal, como a fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3), proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), Rho quinases, além de induzir o aumento de Ca²⁺ intracelular e ativação da proteína quinase C (PKC) (COUGHLIN, 2005).

A expressão de PAR-1 foi reportada em diferentes tipos de células, tais como células endoteliais, fibroblastos, miócitos, bem como em células hematopoiéticas tais como plaquetas, neutrófilos, macrófagos, glóbulos brancos leucêmicos (AUSTIN, COVIC, & KULIOPULOS, 2013; WOJTUKIEWICZ et. al., 2015), enquanto que a expressão de PAR-1, PAR-3 e PAR-4 ativados por trombina foi encontrada em células epiteliais, neurônios, astrócitos, células imunes e diversos tipos de células tumorais (NIERODZIK et. al., 1998; JUNGE et. al., 2004; MELNIKOVA et. al., 2009; VILLARES et. al., 2011; AUSTIN, COVIC, & KULIOPULOS, 2013; LI et. al., 2015; WOJTUKIEWICZ et. al., 2015). Ao longo dos anos, vários estudos mostraram que a superexpressão de PAR-1 está intimamente relacionada ao fenótipo invasivo e metastático em diversos tipos de câncer, incluindo mama (EVEN-RAM ET. AL., 1998; HENRIKSON, SALAZAR & FENTON, 1999) cólon (DARMOUL et. al., 2003; HEIDER et. al., 2004) próstata (CHAY et. al., 2002; KAUSHA et. al., 2006) e melanoma (FISCHER et. al., 1995; MASSI et. al., 2005; MARTÍNEZ-GARCÍA et. al., 2017; TELLEZ et. al., 2003; 2007; VILLARES et. al., 2011). A ativação desse receptor pela trombina se mostra envolvida em eventos mitogênicos e pró-angiogênicos do câncer, como a superexpressão de fatores invasivos, tais como IL-8, VEGF, PDGF2 e MMP-2 (TELLEZ & BAR-ELI, 2003), além de promover a metástase (BAHOU et. al., 2003). O receptor PAR-1 também pode promover uma sinalização em resposta a proteases originárias do tumor e dos microambientes tumorais, como MMP-1. Desta forma, o papel de PAR-1 vai além dos seus efeitos na

coagulação, reparo tecidual e inflamação, mas atuando também de forma significativa na progressão de diversos tipos de tumores, incluindo o melanoma.

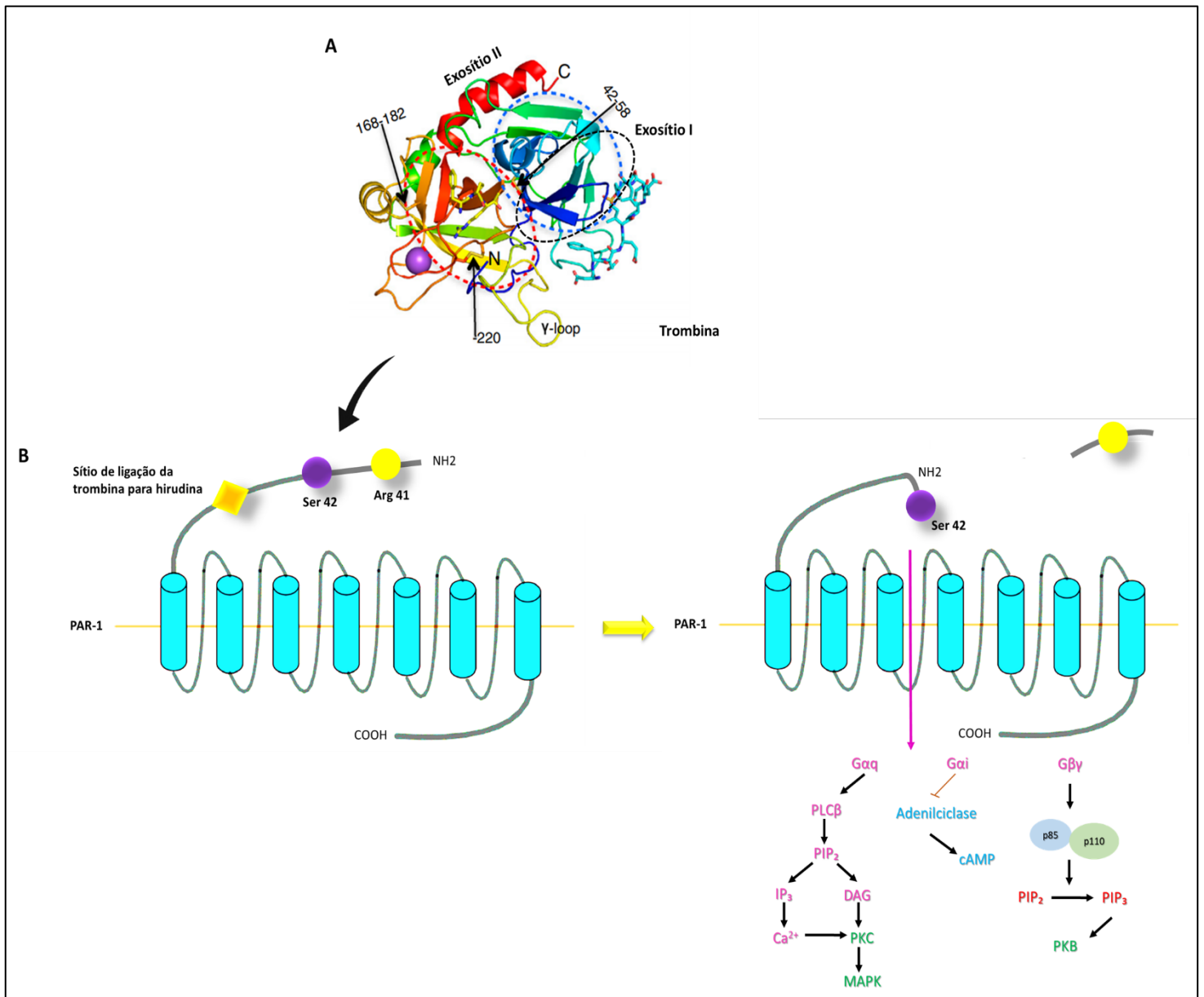


Figura 3. Estrutura da trombina e a ativação de PAR-1 e suas repostas celulares. (A) Diagrama de fita da trombina (somente a cadeia pesada), com ligações dissulfeto representadas como palitos e indicado por setas. A região N-terminal do barril-β está representado predominantemente em azul e indicado pelo círculo oval pontilhado azul, enquanto a região C-terminal está em amarelo e laranja e é indicada pelo círculo oval pontilhado vermelho. O exosítio I é mostrado pelo círculo pontilhado em preto e o Na⁺ (bola roxa) é mostrado entre o loop 180s (laranja) e o loop 220s (vermelho). (Adaptada de LECHTENBERG et. al., 2010). **(B)** A trombina, o principal ativador de PAR-1, liga-se ao domínio de ligação do tipo hirudina na porção N-terminal do receptor e o cliva proteoliticamente entre Arg 41 e Ser 42 de maneira irreversível. A serina 42 atua então como uma âncora de ligação para ativar o PAR-1. Os sinais desencadeados por PAR-1 através das proteínas tipo G Gαq, Gαi e Gβγ ativam PKC, PKB e MAPK, além de inibir a adenilciclase. (Adaptada de VILLARES, ZIGLER & BAR-ELI, 2011).

1.3 A sinalização na biologia tumoral do melanoma

O melanoma é uma condição oncológica cada vez mais incidente e representa a forma mais agressiva de câncer de pele, estando associado à uma alta taxa de mortalidade (GLAZER et. al., 2017; JEMAL et. al., 2010; RETSAS et. al., 2002). De acordo com a GLOBOCAN, o número de novos casos de melanoma em 2018 chegou à 287.723 em todo o mundo (GLOBOCAN, 2019). No Brasil a estimativa de novos casos é de 6.260, sendo 2.920 para homens e 3.340 para mulheres (INCA, 2018), enquanto os últimos dados de mortes registrados foram de 1.794, sendo 1.012 para homens e 782 para mulheres (SIM, 2015). A mutação no gene *BRAF^{V600E}* está presente em 60% dos casos de melanoma relacionados à uma alta exposição solar nas primeiras décadas de vida do paciente, contudo, há relatos de casos de melanoma de pele com ausência desta mutação ou baixa incidência solar prévia (DEVIES et. al., 2002).

De acordo com o modelo de Clark para melanoma, a progressão de formações do tipo nevos hiperplásicos e displásicos para melanoma acontece de forma gradual (CLARK, 1986). Do ponto de vista clínico, os nevos melanocíticos são proliferações benignas que aparecem como crescimentos pigmentados planos ou levemente elevados, geralmente encontrados na pele. Esse nevos são formados por melanócitos em proliferação que assumem gradualmente uma morfologia anormal, tornando-se mais redondos ou ovais, os quais formam “ninhos” ao longo da camada basal e crescem em direção à derme (CLEMENTE et. al., 1991; SHAIN & BASTIAN, 2016). Nevos displásicos podem progredir a partir de nevos benignos pré-existentes ou surgir em novos locais. Clinicamente, são maiores que a maioria dos nevos benignos, têm bordas irregulares, e aparecem com vários graus de pigmentação (TUCKER et. al., 1997). Uma vez estabelecido o melanoma, seu crescimento se dá inicialmente de forma radial, sendo denominado de "melanoma fino". Durante essa fase, as células de melanoma proliferam entre as camadas da epiderme e derme superficial com risco significativamente baixo de metástase. A medida que se desenvolve, o melanoma assume uma aparência mais nodular, uma vez que as células relativamente maiores e irregulares começam a penetrar, invadindo a derme, caracterizando a fase de crescimento vertical, a qual apresenta alto potencial metastático (CLARK, 1986).

De todo modo, a alta taxa de mortalidade no melanoma está associada com a baixa taxa de cura, como resultado principal da falta de prevenção, diagnóstico tardio e a ocorrência de metástase. O potencial metastático de um determinado tipo de câncer é um dos principais indicadores de agressividade do tumor, o qual está diretamente associado ao prognóstico do paciente. A metástase tumoral é alcançada por um processo de múltiplos passos regulado por uma rede de sinalização complexa. A transição de melanócitos normais para células do tipo melanoma está associada à alterações genéticas e moleculares. Apesar do vasto número de estudos disponíveis na literatura, os mecanismos subjacentes à expressão aberrante de genes que contribuem para o desenvolvimento e progressão do melanoma ainda requerem maiores esclarecimentos. A perda ou ganho da função do gene e/ou de um fator de transcrição pode desempenhar um papel importante na progressão do tumor. No melanoma, um conjunto de genes tem sido apontado como um importante alvo na gênese e desenvolvimento do tumor, no qual o PAR-1 parece desempenhar uma função central.

Dois mecanismos participam da regulação de PAR-1: o transporte e dessensibilização do receptor. Em células normais, PAR-1 sofre uma ubiquitinação para então ser internalizado, o que está associado com dímero de clatrina/AP2 (proteína adaptadora 2) e a dinamina (HUDAK et. al., 2017; GRIMSEY, LIN & TREJO, 2014; SOH et. al., 2010). Em seguida, seu transporte para os lisossomos é facilitado pela proteína organizacional nexina-1 (SNX-1). A fosforilação e a interação proteica de PAR-1 com o receptor de quinase da proteína G acoplada acontece em questão de segundos, seguida pela dissociação da proteína G e dessensibilização por PAR-1 (GULLAPALLI et. al., 2006). Em contraste com o rápido e rígido controle da ativação do PAR-1 em tecidos normais, o PAR-1 é ativado constitutivamente em células tumorais. A maioria das respostas celulares são ativadas por um estímulo persistente do segundo mensageiro ERK^{1/2} (TATOUR et. al., 2017; WANG et. al., 2015). Como nos demais tipos de câncer, a sinalização de PAR-1 no melanoma é desencadeada principalmente pela trombina.

Durante as etapas da progressão tumoral, a geração de trombina é frequentemente ativada em resposta à hiperregulação do iniciador da cascata de coagulação, o fator tecidual (FT), expresso constitutivamente na superfície de células tumorais, como o melanoma. Além disso, a ativação da trombina resulta na

clivagem do fibrinogênio em fibrina, gerando depósitos de fibrina que são sedimentados nas paredes do tumor e armazenam trombina ativa, a qual é liberada após a degradação da fibrina pela plasmina (BROMBERG et. al., 1995; MUELLER et. al., 1992). Esse *turnover* da trombina favorece o microambiente do melanoma através da ativação do PAR-1. Dados significativos colocam PAR-1 como um gene chave na evolução do melanoma, correlacionado o aumento de sua expressão com a incitação de eventos orquestrados durante o processo de evolução tumoral e metástase (NIERODZIK & KARPATKIN, 2006; VILLARES et. al., 2008; ZIGLER et. al., 2011).

PAR-1 é superexpresso em células de melanoma metastático, mas não em nevos primários e pele normal (MASSI et. al., 2005; VILLARES et. al., 2008). Além disso, células de melanoma isoladas das lesões metastáticas de pacientes mostraram expressões proteica e de mRNA de PAR-1 aumentadas em comparação com a forma não metastática da doença (SILINI et. al., 2010). A ativação da via de sinalização de PAR-1 foi tida como um fenótipo precursor em células de melanoma. Uma vasta gama de estudos mostrou que em linhagens de melanoma, a sinalização por PAR-1 mobiliza a adesão, invasão, bem como o aumento da secreção de fatores anti-apoptóticos e angiogênicos para promover a invasão e metástase do melanoma (COUGHLIN, 2000; NIERODZIK & KARPATKIN, 2006; VILLARES et. al., 2008; ZIGLER et. al., 2011). Uma vez acoplado à proteínas G, PAR-1 desencadeia vias como as da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), cascata da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), Rho quinase e fosfolipase C- β (PLC- β), todas intrinsecamente envolvidas nos processos de proliferação, migração e adesão celular (COUGHLIN, 2000). A ativação deste receptor de trombina leva à secreção de MMP-1, o que promove o aumento dos níveis de colágeno-1 na pele, e à ativação dos fatores de crescimento EGFR e IGF-1, favorecendo a invasão no melanoma (ZIGLER et. al., 2011). Adicionalmente, PAR-1 favorece diretamente a angiogênese, o qual é considerada um marcador importante da metástase tumoral, através da indução da expressão do fator ativador de plaquetas (PAF), IL-6, IL-8 e do fator pró-angiogênico VEGF em células endoteliais e células de melanoma (Fig. 4).

A regulação transcricional de PAR-1 no melanoma não está totalmente elucidada, porém dados da literatura reportam que o fator transcricional proteína 2 α (AP-2 α) tem uma participação importante na expressão de PAR-1. A perda da

expressão de AP-2 α está associada com a transição da fase de crescimento tumoral radial para a fase de crescimento vertical, na progressão do melanoma (GERSHENWALD et. al., 2001), bem como com reduzidos níveis de p21 e uma baixa taxa de sobrevivência de pacientes com melanoma (KARJALAINEN et al., 1998). A diminuição ou perda deste fator de transcrição está relacionada também com um aumento da expressão de MMP-2 e 9, VEGF, BCL-2 e PAR-1 (BRAEUER et al., 2011). No melanoma, uma análise da região promotora de PAR-1 revelou múltiplos sítios de ligação à AP-2 α e à outro fator transcripcional, o SP-1, bem como dois motivos de ligação sobrepostos em SP-1 e AP-2 α na região 3' proximal (TELLEZ et. al., 2003), sugerindo que esses fatores de transcrição regulam a atividade da região promotora de PAR-1 e suprimem assim a sua expressão. Esse mesmo estudo mostrou que em linhagens de melanoma com pouco ou sem nenhum potencial metastático, AP-2 α se encontra ligado à região promotora de PAR-1, enquanto SP-1 está ligado a PAR-1 somente em células de melanoma metastático. Assim, esses fatores estariam se ligando de maneira mútua e exclusiva em uma das regiões de ligação do receptor de trombina. Esses dados sugerem que no melanoma, os baixos níveis de AP-2 α permitem que SP-1 se ligue aos seus motivos de ligação da região promotora de PAR-1, culminando na ativação deste gene. Contrariamente, em células de melanoma não metastáticas AP-2 α é expresso e ocupa a posição de ligação na região promotora do gene, suprimindo a sua expressão (TELLEZ et. al., 2003).

Além de promover efeitos diretos sobre atividades biológicas pró-tumorais, PAR-1 é capaz de modular a expressão de outros genes envolvidos no sucesso do tumor, formando um complexo sistema de sinalização gênica no melanoma (Figura 2). Há uma década, o gene da proteína de canal conexina 43 (Cx-43) foi identificado como sendo um importante alvo da modulação de PAR-1 no melanoma. As conexinas são proteínas de canais de membrana intracelular que controlam a passagem de moléculas menores que 1,2kD, entre células adjacentes, e atuam também como proteínas de membrana com propriedades adesivas (COTRINA, LIN & NEDERGAARD, 2002). A ligação entre células tumorais em transição de um local primário para um órgão secundário requer a ligação e migração de células tumorais através do endotélio vascular. Essa comunicação entre células tumorais e células endoteliais demonstrou ser mediada por conexinas e é essencial para o

extravasamento de células tumorais para o local metastático (ZEFFERINO et. al., 2019). Apesar das funções bem descritas das conexinas, como migração, regulação da morfologia celular e até rigidez da célula (HANAHAN & FOLKMAN 1996), o papel destas proteínas de canal no câncer à nível molecular ainda é controverso.

Alguns trabalhos sugerem que as conexinas parecem atuar como supressores de tumores, porém não foram encontradas mutações no gene conexina, como é comumente mostrado para genes supressores de tumores (MESNIL et. al., 2005) e nenhum mecanismo claro de controle do crescimento foi estabelecido para estas proteínas, ao contrário do que já foi observado para supressores de tumores conhecidos. A literatura traz relatos de conexinas atuando tanto como supressores de tumores quanto como facilitadores do processo tumoral. Elzarrad e colaboradores observaram que a Cx-43 desempenha um papel importante na metástase, particularmente durante as etapas de invasão e adesão endotelial durante a comunicação entre células provavelmente devido à diferenças nas expressões das conexinas, algumas células tumorais podem se encontrar na fase de proliferação (Cx-43 não expressa), enquanto outras células tumorais estaria na fase de migração (Cx-43 expressa) (ELZARRAD et. al., 2008).

No melanoma, apesar de um estudo ter mostrado que a superexpressão de Cx-43 suprime a angiogênese tumoral, através da diminuição da atividade transcricional do fator de hipóxia HIF-1 α e inibição da expressão de VEGF (WANG et. al., 2014), a maioria dos trabalhos relacionam o aumento da expressão de Cx-43 com o aumento da atividade adesiva de células de melanoma ao endotélio, o que favorece o extravasamento do tumor para outros tecidos (CHEN et. al., 2016; LIN et al., 2010; SIERN et. al., 2012; VILLARES et. al., 2009). Interessantemente, no melanoma, Cx-43 sofre uma regulação gênica direta por PAR-1. O silenciamento de PAR-1 resulta na diminuição da ligação de células de melanoma metastático à células endoteliais humanas, juntamente com uma diminuição significativa na expressão de Cx-43, como resultado da ligação reduzida da sua região promotora aos fatores de transcrição SP-1 e AP-1 (VILLARES et. al., 2009).

Um dos efeitos biológicos mais diretos de PAR-1 sobre o melanoma é a modulação direta sobre as quinases que controlam a maquinaria de proliferação no câncer. Uma das principais características do câncer é a rápida e desordenada proliferação das células cancerígenas. As mutações gênicas em BRAF e NRAS são

responsáveis pela tumorigênese no melanoma e desencadeiam as primeiras respostas cancerígenas através da regulação das vias de sinalização das quinases pró-mitogênicas PI3K/Akt, MAPK/ERK, e c-KIT (KYRGIDIS et al. 2010). Dentre essas, PI3K e MAPK são as principais vias no desenvolvimento do melanoma, responsáveis pela regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Mutações em BRAF são frequentemente encontradas ainda durante a formação de nevos melanocíticos, sugerindo que esse evento ocorra nas etapas iniciais da progressão do melanoma (POLLOCK et al., 2003). Além disso, 25% dos casos de melanoma apresentam mutações em NRAS e uma pequena fração dos melanomas apresentam ainda ou mudanças no perfil de ativação de KIT ou fusões/translocações de ALK ou ROS com outros genes, todas resultando em um *feedback* positivo na sinalização de MAPK (BASTIAN et al., 2014). Assim, os dois principais oncogenes no melanoma BRAF e NRAS são responsáveis por ativar a via de sinalização de MAPK ainda nos estágios mais iniciais do desenvolvimento do melanoma (ELLERHORST et al. 2011; BASTIAN, 2014), e mais importante, essas mutações ocorrem de maneira exclusivamente mútua, e em cerca de 75% de todas as mutações inerentes no melanoma em qualquer um dos genes (HOCKER & TSAO 2007; CURTIN et al. 2005). Essa relação mostra a importância da via de MAPK na progressão do melanoma como um importante alvo terapêutico.

A descoberta das mutações de BRAF também trouxe indícios da participação de outros membros de vias também importantes no desenvolvimento do melanoma. A proteína de baixo peso molecular GTPase RhoA responsável pela ativação do eixo RhoA/RhoA quinase, regula a dinâmica do citoesqueleto de actina, participando ativamente nas atividades de proliferação e migração celular no melanoma. Em células de melanoma a quimiocina CXCL12 ativa RhoA, a qual desempenha uma função importante durante a invasão e metástase (BARTOLOME et al., 2004; ROBLEDO et al., 2001). A ativação de RhoA ocorre através do acoplamento de proteínas G à fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) Rho. Os ligantes de receptores de proteína G mais eficazes na ativação de RhoA incluem o ácido lisofosfatídico, esfingosina-1-fosfato, tromboxano A2 e trombina (DJELLAS et al., 1999; MOERS et al., 2003; SIEHLER et al., 2001; WALSH et al., 2008; ZHAO et al., 2014). PAR-1 também é capaz de acoplar à proteínas G e promover a ativação de RhoA (COUGHLIN, 2000). Assim, a trombina atua de forma direta sobre a

ativação de RhoA, se ligando à proteínas G e de forma indireta, quando se liga e ativa PAR-1, que por sua vez também ativa RhoA. A ativação da sinalização de RhoA mediada pela trombina, culmina ainda na ativação do principal fator de transcrição inflamatório, o NF- κ B (DUSABAN et. al., 2013; LEONARD et.al., 2013).

A transcrição mediada por NF- κ B é a principal regulação na expressão de diversas citocinas e quimiocinas que influenciam as propriedades das células linfóides e mielóides no microambiente tumoral. (RICHMOND & YANG, 2016). No melanoma a ativação frequente de NF- κ B está associada à mutação do tipo BRAF^{V600E} (GUARNERI et. al., 2017). Células de melanoma frequentemente expressam níveis de citocinas e seus receptores que variam de acordo com os diferentes estágios da progressão da doença. As interleucinas (IL) 1 β , IL-6 e IL-8, por exemplo, são conhecidas por serem importantes fatores determinantes na proliferação celular e progressão do melanoma (JENKINS, BRINCKERHOFF & MULLINS, 2015; RICHMOND, YANG & SU, 2009). Nevos e melanomas primários finos (menos de <1 mm de espessura) expressam baixos níveis de IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), enquanto melanomas mais avançados (> 1mm de espessura) mostram regulação positiva de IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF- α , TGF- β e do fator de estimulante de colônias do tipo macrófago-granulocítico (GM-CSF) (MORETTI et. al., 1999). Assim, à medida que o tumor se desenvolve há um aumento dos níveis destas citocinas, mostrando uma clara relação entre o desenvolvimento tumoral e a produção de citocinas mediada por NF- κ B. A hiperexpressão de NF- κ B por sua vez, pode ativar também a sinalização de PAR-1, dando embasamento à um ciclo vicioso de resposta inflamatória no câncer mediado pelo eixo PAR-1/RhoA/NF- κ B/PAR-1.

Por conseguinte, PAR-1 promove uma sinalização sobre outro receptor que tem uma participação importante no melanoma, o receptor do ativador de plaquetas (PAFR). A ativação de PAR-1 em células de melanoma aumenta positivamente a expressão de PAFR e a secreção de seu ligante PAF, gerando vários efeitos no microambiente do melanoma, como adesão de células tumorais à células endoteliais, crescimento tumoral, angiogênese e metástase (MELNIKOVA, VILLARES & BAR-ELI, 2008). PAF é responsável pela ativação das plaquetas, promovendo a formação de agregados de plaquetas e células tumorais, denominados trombos mistos. Esses agregados uma vez circulantes na corrente

sanguínea, embolizam, levando à isquemia e exposição do endotélio. Como resultado, células tumorais e plaquetas se ligam com mais avidéz à membrana e matriz basal subendotelial e assim, esses êmbolos tumorais levam à um extravasamento tumoral para o parênquima tecidual e à formação de vasos colaterais no tumor, pela neoangiogênese (NIERODZIK & KARPATKIN, 2006). Além disso, esses agregados plaquetário-tumorais protegem as células tumorais do reconhecimento pelas células de defesa *natural killer* (células NK) (NIESWANDT et. al., 1999), formando uma espécie de “escudo” que previne o ataque do tumor pelo sistema imunológico. Desta forma, uma relação estreita entre plaquetas e células tumorais se desenvolve, propiciando uma rápida e eficiente produção de trombina pelo tumor, uma vez que as plaquetas fornecem uma superfície catalítica para a geração de trombina a partir de proteínas coagulantes. Essa comunicação leva à uma ligação forte entre plaquetas e células tumorais, mediada pela ligação da integrina plaquetária IIb-IIIa às integrinas tumorais via fator de Von-Willebrand (VWF) e fibronectina (NIERODZIK & KARPATKIN, 2006).

A ligação de PAF ao seu receptor PAFR, eleva também os níveis da expressão proteica e de mRNA da molécula de adesão celular de melanoma (MCAM)/MUC18 (CD146) em células de melanoma, que por sua vez, promove a adesão das células de melanoma às células endoteliais e aumenta a expressão de MMP-2 (MELNIKOVA et. al., 2009), culminando na invasão tumoral e metástase. A expressão de PAFR é detectada em queratinócitos, mas não em melanócitos, sugerindo que o recrutamento progressivo de melanócitos para a derme seja impulsionado pelos queratinócitos e, possivelmente, pelos fibroblastos e mastócitos acumulados durante esse processo. Essas células são responsáveis pela regulação da homeostase da pele e participam ativamente no comportamento dos melanócitos residentes, bem como no crescimento do melanoma e na invasão maligna local (MASSI et. al., 2005). Relatos demonstram que a hiperexpressão de PAFR ocasiona alterações progressivas hiperproliferativas na epiderme, como a hiperplasia de queratinócitos acompanhada de hiperpigmentação (ISHII et. al., 1997; SATO et. al., 1999). Esses achados colocam a expressão de PAFR como um importante indicador de agressividade tumoral no melanoma.

A ativação plaquetária também é capaz de estimular um dos mais importantes eventos biológicos do câncer, a angiogênese. Uma vez ativadas pela trombina, as

plaquetas são capazes de promover, não somente a síntese e secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), mas também a síntese do oncogene- α relacionado ao crescimento das células tumorais, PDGF e angiopoietina-1, além do aumento do domínio da angiopoietina-2 em células endoteliais (LI et. al., 2001). O melanoma é altamente angiogênico nos sítios primários e esse fenótipo é contribuído pelas moléculas inflamatórias secretadas por ambas células de melanoma e por células do microambiente do local afetado. Uma vez que as células tumorais extravasam para o parênquima, iniciam o processo de angiogênese e proliferação para estabelecer uma nova metástase (BRAEUER et. al., 2013). Sem angiogênese o tumor se torna hipóxico e carece de nutrientes necessários para a sua sobrevivência, fazendo desse evento uma etapa crucial para a progressão do tumor.

O fenótipo angiogênico do melanoma está entre os principais responsáveis pelo alto potencial metastático do melanoma. Moléculas como VEGF-A, VEGF-C, fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF), PAF, IL-8 e o ácido lisofosfatídico lipídico (LPA) são os principais efetores que contribuem para a progressão do melanoma via angiogênese e linfangiogênese. VEGF-A, o principal fator pró-angiogênico foi uma das primeiras moléculas identificadas como indutoras da formação de vasos (LEE et. al., 2007). A expressão de VEGF é estimulada pelo fator induzido por hipóxia-1 α (HIF-1 α) (KROCK, SKULI & SIMON, 2011). Quando ocorre hipóxia dentro ou nas mediações do tumor as propriedades malignas cancerígenas como invasão e metástase tendem a aumentar, juntamente com resistência à quimioterapia (LU & KANG, 2010; ROHWER & CRAMER, 2011; SHAY et. al., 2014). Essas alterações induzidas por hipóxia são mediadas, em parte pela atividade transcricional da via de sinalização de HIF-1 α , a qual é capaz de promover a transcrição de mais de 400 genes alvos conhecidos. Dentre estes genes, o VEGF-A tem um papel fundamental na malignidade do melanoma. Pacientes com melanoma metastático exibem uma abundância nos níveis de VEGF e HIF-1 α em seus tumores (MARTÍNEZ-GARCÍA et. al., 2017). O papel do VEGF como principal favorecedor da angiogênese já é bem estabelecido e por isso tem sido associado como um importante marcador da agressividade do melanoma. Por fim, a expressão de VEGF, juntamente com outras moléculas pró-angiogênicas como MMP-2 e IL-8 são também estimuladas diretamente através da sinalização por PAR-1 (LIU et. al.,

2014; HUANG et. al., 2015; VILLARES et. al., 2008; VILLARES, ZIGLER & BAR-ELI, 2011; XIE et. al., 2016), agregando também o efeito pró-angiogênico à esse receptor na ascensão do melanoma.

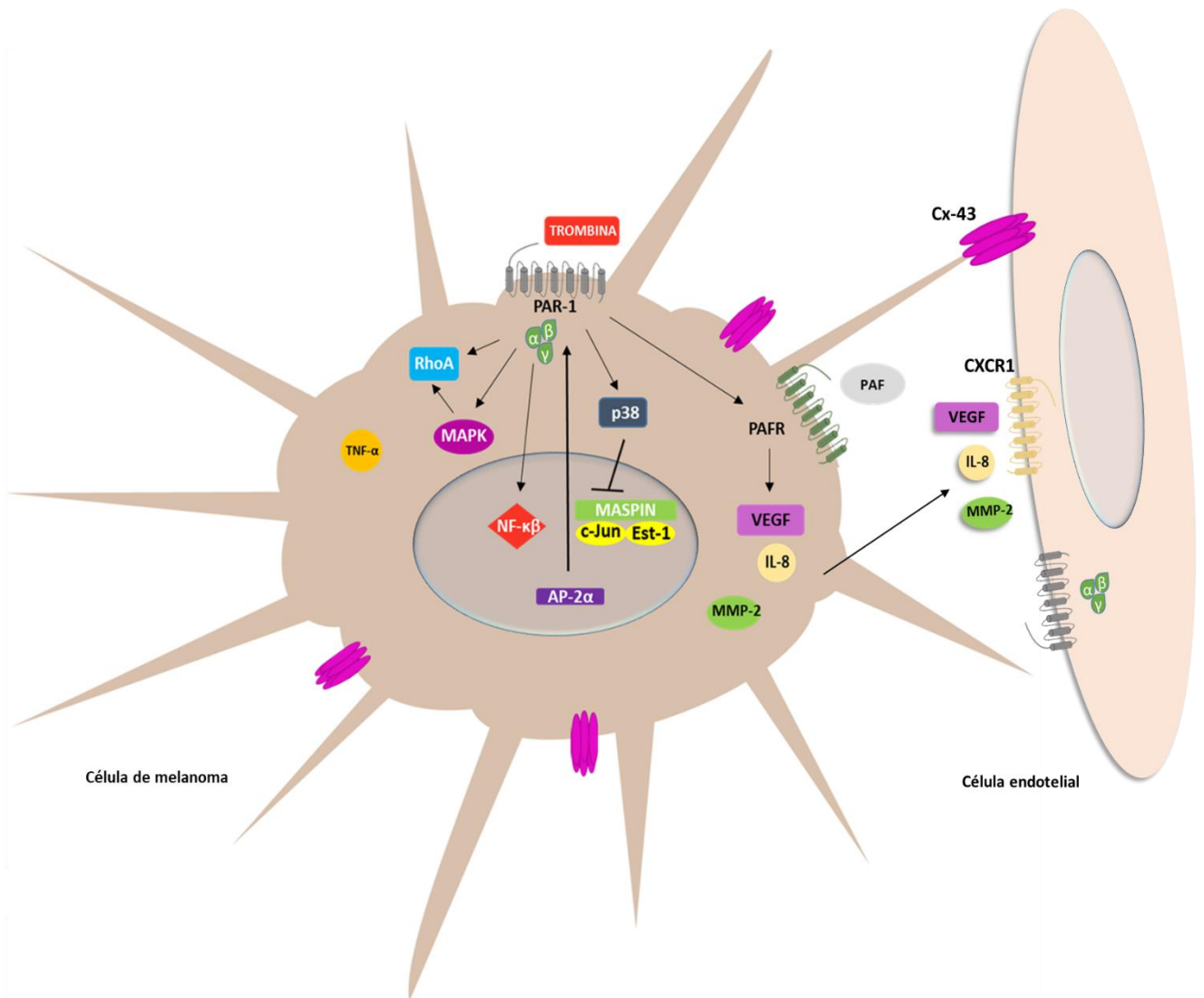


Figura 4. Regulação de PAR-1 no melanoma e a sinalização de moléculas envolvidas na progressão do melanoma. A sinalização celular desencadeada por PAR-1, através da proteína G, aumenta os níveis de moléculas envolvidas na proliferação, migração, invasão e angiogênese, incluindo IL-8, VEGF, PAF, MMP-2 e conexasinas.

O papel de PAR-1 no melanoma têm sido amplamente estudado e ao longo dos anos tem-se despertado um grande interesse na comunidade científica devido ao seu potencial terapêutico emergente. Os inibidores de PAR-1 podem trazer efeito antitumoral através da inibição da proliferação de células tumorais, redução da invasão tumoral e angiogêneses, bem como metástase. Atualmente, o vorapaxar

(SCH530348) e o atopaxar (E5555) são as duas formulações clínicas de inibidores da PAR-1 que passaram por amplo desenvolvimento clínico (KALANTZI et. al., 2012; KRANTZ & KAUL, 2015). Contudo, os estudos de inibidores de PAR-1 no câncer ainda são escassos e requerem um maior aprofundamento. Visto o ascendente interesse de PAR-1 como alvo na terapia do câncer, a identificação e estudo de novos inibidores desse receptor, bem como de seu principal ativador, a trombina, é de grande importância biotecnológica. Neste sentido, destacam-se os glicosaminoglicanos pelo seu conhecido potencial anti-trombina.

Recentemente foi caracterizado um CS obtido do camarão *Litopenaeus vannamei* (sCS) com atividade anti-inflamatória *in vivo*, capaz de inibir a trombina de forma direta e através do HCII (PALHARES et. al., 2019) e por isso, foi despertado nosso interesse em avaliar o potencial deste composto sobre o desenvolvimento do melanoma, um tipo de câncer que apresenta uma modulação intrínseca através do principal receptor da trombina, o PAR-1.



OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo determinar as características estruturais de um CS isolado do cefalotórax do camarão *Litopenaeus vannamei* e avaliar seu potencial antitumoral através dos processos de migração, proliferação celular e produção de citocinas e sobre os níveis de expressão gênica de genes relacionados ao desenvolvimento do melanoma.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair e purificar o sCS a partir do cefalotórax de *L. vannamei*, e determinar a sua massa molecular e composição dissacarídica;
- ✓ Estudar o potencial antitumoral do sCS de *L. vannamei* através de:
 - Avaliação do efeito citotóxico, indução de morte celular e apoptose do sCS sobre células de melanoma;
 - Análise de seu efeito sobre a migração celular através de uma membrana permeável e ensaio de reparo da fenda;
 - Investigação do efeito do sCS sobre a clonogenicidade de células de melanoma e sobre seu crescimento independente de ancoragem;
 - Avaliação do efeito do sCS sobre a expressão de genes relacionados à progressão tumoral em células de melanoma;
 - Investigação de sua ação sobre a produção de citocinas e melanina em células de melanoma;
 - Avaliação de seu efeito sobre o crescimento tumoral *in vivo*;
 - Avaliação do efeito do sCS sobre a expressão de genes relacionados à progressão tumoral em tumores de melanoma e pulmões de camundongos;
 - Investigação de sua ação sobre a produção de citocinas e VEGF em plasma de camundongos com crescimento tumoral;
 - Avaliação do efeito do sCS sobre a histologia e imuno-histoquímica para PAR-1 e VEGF em cortes de tumores e pulmões de camundongos submetidos ao ensaio de crescimento tumoral.



METODOLOGIA



3. METODOLOGIA

3.1 Materiais Biológicos

3.1.1. Camarão *Litopenaeus vannamei*

O material biológico utilizado como matéria prima para extração do sCS foi o cefalotórax (cabeça) do camarão *Litopenaeus vannamei*, conhecido popularmente como camarão branco do pacífico. O material foi gentilmente cedido pela empresa Enseg Indústria Alimentícia LTDA., localizada na BR 304, Macaíba-RN, e foi mantido sob refrigeração até o processamento.

3.1.2. Animais

O experimento de crescimento tumoral *in vivo* para a determinação da atividade anti-melanoma do sCS de *L. vannamei* foram realizados com 40 camundongos machos da linhagem C57Bl/6 (black), com dois meses de idade, pesando entre 25 e 30 g, gentilmente cedidos pelo Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz - PE, e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Os animais receberam água e dieta *ad libitum* e os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa – CEUA/UFRN (Protocolo 003/2018, CERTIFICADO nº 081.003/2018).

3.1.3. Linhagens celulares

Para investigar o efeito do sCS isolado do camarão sobre o crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro*, foram escolhidas as células de melanoma murino B16F10, as quais foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina e antibióticos. Para subcultivo, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com uma solução de tripsina a 0,2%, por 5 min., a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, a tripsina foi inativada pela adição de meio contendo SFB e as células desprendidas da garrafa foram centrifugadas em tubo cônico de 15 mL. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi

cuidadosamente ressuspenso em novo meio contendo 10% de SFB. A suspensão celular foi transferida para uma nova garrafa, a qual foi colocada na estufa e as trocas de meio foram realizadas a cada dois dias.

3.2. Reagentes e outros materiais

- 1,3-diaminopropano e cetiltrimetilamônio (CETAVLON) foram adquiridos da Aldrich Chemical Co. Inc. (Millwaukee, WI, EUA).
- Ácido acético, acetona, metanol, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e cristal violeta, foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Agarose (Standard-Low-Mr) foi adquirida da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
- Anticorpos anti-PAR-1 e anti-VEGF foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA);
- Condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato, extraídos de cartilagem de baleia e cartilagem de tubarão, respectivamente. Dermatan sulfato, extraído de pele de porco, foram adquiridos da Miles Laboratories (Elhart, IN, EUA);
- Enzimas condroitinases AC e ABC foram adquiridas da Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA);
- Etanol e benzina foram adquiridos da Cromato Produtos Químicos Ltda. (Diadema, SP, Brasil).
- Heparina de baixo peso molecular (enoxaparin) foi obtida do Laboratório Sanofi-Aventis Farmacêutica (São Paulo, SP, BRASIL).
- Kit para dosagem de citocinas 1L-1 β , TNF- α e VEGF por ELISA da eBioscience (New Jersey, NY, EUA);
- Resina de troca iônica Lewatite da Bayer, gentilmente cedida por Açúcar Guarani S/A (Olimpia, São Paulo, lote AD001).
- Superase foi adquirida da Prozyn Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- TaqMan® Gene Expression Assays foi adquirido da Thermo-Fisher (Waltham, MA, EUA).

- TRizol foi adquirido da Thermo-Fisher (Waltham, MA, EUA).
- Viocase, extraída de pâncreas de porco, foi adquirida da Gibco (Life Technologies, Rockville, MD, EUA), a qual contém uma mistura de esterases, peptidases, nucleases, elastases e colagenases.

Os demais reagentes e materiais utilizados foram da melhor qualidade disponível.

3.3. Aparelhos

Além dos aparelhos usuais de laboratório, foram utilizados:

- Banho-maria metabólico Dubnoff, modelo TE-053, mesa agitadora modelo TE-140 e balança modelo B-TEC-2200 da TECNAL – Equipamentos para Laboratórios Ltda. (Piracicaba, SP, Brsail);
- Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col. (1968), (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- Capela de fluxo laminar Pachane, Pa300, Piracicaba/SP;
- Centrífuga refrigerada, modelo CR 21da Hitachi Koki Co. Ltda. (Tóquio, Japão);
- Espectrofotômetro de microplaca Epoch, BioTek (Winooski, Vermont, E.U.A.);
- Incubadora de CO₂ Thermofarmo série II, modelo 3110-EUA.
- Leitor de ELISA para fluorescência, modelo Victor² 1420, com sistema “mullabel conter”, da Pekin-Elmer Life Sciences-Wallac Ou. (Turku, Finlândia);
- Medidor de pH modelo FTP 125 da IMPRINT do Brasil Ltda. (Campinas, SP, Brasil);
- Microscópio invertido com contraste de fase, modelo TS-300 da Nikon (Tóquio, Japão);
- Purificador de água Milli-Q[®] Water System da Millipore Corp. (Bedford, MA, EUA).

3.4. Extração de glicosaminoglicanos e purificação dos compostos tipo CS do camarão *L. Vannamei*.

O processo de extração de GAGs do camarão foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Brito et al. (2008). Brevemente, o material biológico (8,2 Kg de cefalotórax do camarão) foi triturado e delipidado com acetona. A massa obtida após o processo de delipidação foi seca e triturada para formação de um pó, o qual foi homogeneizado com NaCl 1,0M e submetido à proteólise por 24 horas, a 60°C. Em seguida, a mistura foi filtrada e a suspensão obtida foi complexada com resina de troca-iônica (Lewatit), a qual foi eluída com NaCl 3,0M, obtendo-se um *pool* de GAGs que foi denominado de Fração 3,0M (F-3,0M). A partir dessa fração, foi realizado fracionamento com acetona, adicionando volumes crescentes (v/v) 0,5; 0,7; 1,0 e 2,0. Em seguida, o composto tipo CS foi purificado através da F-1,0A por cromatografia de troca-iônica em DEAE-Sephacel, eluída com NaCl nas molaridades de 0,5, 0,8 e 1,0 M. Os eluatos foram analisados quanto a presença de GAGs através da dosagem de ácido urônico por meio do ensaio de Carbazol (DISCHE, 1947). O composto eluído com 1,0 M de NaCl foi dessalinizado através de coluna de gel-filtração G-25, eluído com etanol 10%. Após liofilização o composto purificado, sCS (40 mg) foi submetido à análises posteriores.

3.5 Eletroforese

O composto purificado foi avaliado por eletroforese em gel de agarose (0,6%) em tampão Diaminopropano (PDA) 0,05 M, pH 9,0. O gel foi submetido a 100 V em cuba refrigerada a 4°C utilizando-se como indicador de corrida o vermelho de cresol. Após a corrida, o gel foi fixado com CETAVLON (0,1%) por no mínimo 2 horas, seco sob corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1%, em ácido acético 0,1% e etanol 50%. Depois de retirado o excesso com solução descorante, o gel foi seco a temperatura ambiente.

3.6. Análise estrutural do composto tipo CS do camarão *L. Vannamei*.

3.6.1 Determinação do peso molecular

O peso molecular (PM) do sCS foi determinado por cromatografia de permeação em gel em um sistema de cromatografia líquida de alta pressão (GPC-HPLC), utilizando uma coluna de 300 × 7,8 mm BioSep SECTM S-2000 LC (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Alíquotas de 20 µL de solução de sCS (10 mg/mL na fase móvel de Na₂SO₄ 0,3 M) foram aplicadas no sistema GPC-HPLC a uma taxa de fluxo constante de 1 mL/min. A detecção de UV foi realizada à 205 nm à temperatura ambiente. A coluna foi previamente calibrada com polissacarídeos de pesos moleculares conhecidos; 1,7, 4,0, 10,0 e 16,0 kDa, correspondentes a fondaparinux sódico, enoxaparina, heparam sulfato e heparina não fracionada, respectivamente.

3.6.2 Digestão enzimática e análise por HPLC

A digestão enzimática foi realizada como previamente descrito (LIMA, HUGHES, et al., 2013). 100µg do composto tipo CS isolado do camarão foi incubado com uma mistura de liases (2,5 mUI cada – TRIS-HCl PH 8.0, 60 mM acetat de sódio) do tipo condroitinase AC II e ABC de *Flavobacterium heparinum*, as quais degradam compostos tipo condroitim sulfato e dermatam sulfato, respectivamente. Os dissacarídeos produzidos foram submetidos à uma cromatografia de alta performance (HPLC) do tipo 150×4,6 mm Phenosphere SAX (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) utilizando um gradiente de 0 à 1M de NaCl, durante 30 minutos com fluxo de 1mL/min e a detecção foi feita através de leitura de absorbância de UV à 232 nm. Os picos corresponderam às posições de eluição dos seguintes padrões dissacarídicos conhecidos: ΔUA β (1→3) GalNAc 6-O-sulfato; ΔUA β (1→3) GalNAc 4-O-sulfato; ΔUA β(1→3) GalNAc 4,6-di-O-sulfato, onde ΔUA representa GlcA.

3.6.3 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN foram realizadas com 200 µL de sCS em D₂O contendo trimetil-sililpropanosulfonato de sódio (DSS) 100 µM a 343 K usando um espectrômetro Bruker Avance II⁺ 600 MHz equipado com um CryoProbe TCI do Instituto de Biologia Integrativa da Universidade de Liverpool, Reino Unido. Além dos espectros unidimensionais (¹H-RMN e ¹³C-RMN), foram coletados os espectros bidimensionais homonucleares (COZY, TOCSY e

NOESY) heteronucleares (HSQC e HMBC). Os espectros TOCSY foram medidos com um tempo de mistura de 120 ms, enquanto os tempos de mistura dos espectros NOESY estavam entre 30 e 240 ms. Os espectros foram processados usando o Bruker TopSpin e atribuídos usando o software *Collaborative Computing Project for NMR Analysis* (VRANKEN et al., 2005). A integração de $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ HSQC foi realizada usando o software *INFOS* para ajuste de espectro (SMITH, 2017). A integração do espectro de prótons foi realizada usando o software *Bruker TopSpin* para calcular a proporção de cada variante de resíduo presente na amostra do polissacarídeo. Os parâmetros completos de aquisição são fornecidos em uma tabela no anexo deste documento.

3.7. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do sCS do camarão *L. Vannamei*.

3.7.1 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi investigada utilizando o Alamar Blue[®], o qual contém um indicador redox que, na presença de células metabolicamente ativas, muda da forma oxidada (azul e não fluorescente) para a forma reduzida (rosa e fluorescente). Para isso, células endoteliais ou células de melanoma B16F10 ($1,0 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços por 1 h, para adesão. Em seguida, o meio foi aspirado e as células foram tratadas com 100 μL de CS do camarão ou heparina nas concentrações de 25, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$, por 24 h, 37°C e 5% de CO_2 . Meio de cultura foi utilizado como controle positivo. Após o período de tratamento, foi adicionado Alamar Blue[®] em uma quantidade igual a 10% do volume do meio contido em cada poço e a placa foi incubada por 4 h, a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, a quantidade de alamar reduzido foi monitorada por absorvância a 570 e 600 nm. Os valores obtidos foram usados para determinar a viabilidade celular por meio da fórmula:

$$\left\{ \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_o)}{A'_{570} - (A'_{600} \times R_o)} \right\} \times 100$$

Onde:

A_{570} e A_{600} = absorvância a 570 e 600 nm, respectivamente, dos poços contendo tratamento com heparina ou heparinoide.

A'_{570} e A'_{600} = absorvância 570 e 600 nm, respectivamente dos poços contendo apenas células + meio, sem tratamento (controle).

R_o = fator de correção

3.7.2 Análise por citometria de Fluxo

A morte celular das células tumorais foi avaliada através do Kit de detecção de apoptose e necrose usando marcação isotiocianato de fluoresceína (FITC) e anexina V/iodeto de propídio (IP) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram coletadas por tripsinização, lavadas com tampão salino-fosfato (PBS) e centrifugadas para coletar o *pellet* celular. O número de células foi ajustado para 1×10^6 células/poço. As células foram então ressuspensas em tampão de ligação (10 mM HEPES, NaCl 140 mM e CaCl_2 2,5 mM, a pH 7,4) e marcadas com Anexina V, FITC e IP à temperatura ambiente, durante 15 minutos no escuro. A Análise da Citometria de Fluxo foi realizada usando Citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) dentro de 1 h após a marcação. A anexina V marcada com FITC foi analisada através da excitação e emissão de 488 e 535 nm, respectivamente. O IP foi analisado usando excitação e emissão de 488 e 575 nm, respectivamente. Para cada análise, 10 000 células foram necessárias. As percentagens de células foram calculadas usando o software FlowJo (FlowJo LLC). Os índices apoptótico e necrótico (%) foram calculados como a soma de atraso das células apoptóticas/necróticas divididas pelo número total de eventos.

3.7.3 Ensaio de reparo da fenda (*Wound healing*)

O ensaio de reparo da fenda foi realizado como descrito por Rodriguez, 2005. Resumidamente, 1×10^5 células B16F10 foram cultivadas em placas de 24 poços. O meio DMEM foi substituído por meio contendo sCS ou heparina nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e as células em monocamada foram removidas no modelo de uma fenda no centro do poço, raspando-as com uma micropipeta de 1000 μL . A placa foi então colocada em uma incubadora (37°C e 5% de CO_2) acoplada à um microscópio de leitura óptica em 40x e a cada horário indicado (0, 6, 12, 24h e 48h) após a raspagem, fotografias de cada poço foram realizadas automaticamente.

3.7.4 Ensaio de migração celular (*transwell*)

O efeito do sCS sobre a migração celular foi investigado utilizando insertos de *transwell* (ThinCert™, Greiner Bio-One, Alemanha), que contêm uma membrana porosa de 8,0 µm, em placa de 24 poços. Inicialmente cada inserto foi hidratado através da adição de 500 µL de meio DMEM com soro e fibronectina (40µg/mL) no compartimento inferior ao inserto, afim de criar um gradiente de concentração. Após 1h a 37°C e 5% de CO₂, o meio foi descartado e cada poço contendo o inserto foi lavado com PBS 3 vezes. Em seguida, no compartimento inferior foram adicionados 500 µL de meio DMEM com soro e no compartimento superior de cada inserto foram adicionados 300 µL de suspensão de células B16F10 (3,0 x 10⁵) em meio sem soro. Após as células aderirem, foram adicionados 50 µL de meio sem soro nos insertos referentes aos controles positivo e negativo. Nos demais insertos, foi adicionado o mesmo volume de meio sem soro, porém, contendo heparina ou sCS nas concentrações de 25, 50 ou 100 µg/mL. Nos poços referentes ao controle negativo foi adicionado apenas meio sem soro. Portanto, nesses poços não houve estímulo à migração. A placa foi mantida a 37°C e 5% de CO₂. Após 4h, as células que migraram, atravessando a membrana microporosa, fixaram-se na superfície inferior da mesma. Os insertos foram lavados com PBS e as células foram fixadas com formaldeído 2% por 30 minutos e, em seguida, coradas com cristal violeta 0.2%. As células que não migraram foram removidas da face superior da membrana do *transwell* com hastes flexíveis contendo algodão nas extremidades. Os insertos agora, contendo apenas as células que migraram, foram visualizadas em microscópio de fluorescência, fotografadas e o número de células que migrou foi determinado utilizando o software Image J.

3.7.5 Ensaio clonogênico

Para a realização desse ensaio, células B16F10 (100 células/poço) foram plaqueadas em placas de 06 poços e cultivadas por 4h a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, o meio foi substituído por novo meio contendo heparina ou sCS nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL. As placas foram

mantidas na estufa por 10 dias e a cada três dias o meio de cada poço foi trocado por um novo meio contendo também as amostras. Após o tempo de incubação, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS, fixadas com Bouin e coradas com cristal violeta 0,2%, por 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de corante. Cada poço foi fotografado e a área do poço ocupada pelas colônias foi determinada utilizando o software de análise Image J. Os valores foram expressos em porcentagem da área em relação ao controle, onde as células não foram tratadas com os compostos.

3.7.6 Ensaio de proliferação celular independente de ancoragem

Placas de 06 poços foram forradas com 1,5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB) e 0,8% agarose. Após a polimerização da agarose, $1,0 \times 10^3$ células B16F10 foram plaqueadas em 3 mL de meio suplementado com 10% de SFB e 0,4% de agarose. Após a polimerização, foram adicionados 2,5 mL de meio de cultura contendo sCS (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) em cada poço. O meio foi trocado a cada três dias. Após 10 dias, as colônias formadas foram visualizadas e fotografadas. A área do poço ocupada pelas colônias foi determinada utilizando o software Image J. Os valores foram expressos em porcentagem da área em relação ao controle, onde as células não foram tratadas com os compostos.

3.7.7 Quantificação do conteúdo de melanina

As células B16F10 (5×10^4 células / poço) foram cultivadas em placas de 6 poços e expostas ao sCS e heparina em concentrações de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Após 48h, as células foram tripsinizadas, centrifugadas ($1600 \times \text{g}$, 4 °C, 5 min) e lavadas com PBS. Após mais um ciclo de centrifugação, as células foram então lisadas com a adição de NaOH 1M e a absorbância foi mensurada à 475 nm usando o espectrofotômetro Epoch de microplacas da Biotek Instruments Inc. (Winooski, VT, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de melanina produzida em relação ao controle do grupo (células mantidas apenas com meio DMEM).

3.7.8 Análise da expressão gênica

3.7.8.1 Extração de RNA

In vitro

Placas de 06 poços foram plaqueadas com $2,4 \times 10^6$ células B16F10 em meio suplementado com 10% de SFB. Após 4h, foram adicionados 1,5 mL de meio de cultura contendo sCS ou heparina à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em cada poço. Após 48hs o meio foi removido e as células foram lisadas com Trizol e a extração do RNA foi realizada de acordo com as instruções do kit para extração PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

In vivo

Secções dos tumores dos animais submetidos ao experimento de crescimento tumoral, bem como o lóbulo esquerdo do pulmão de cada animal foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente após sua excisão e posteriormente submetidos à maceração em nitrogênio líquido. As amostras maceradas foram tratadas com Trizol para extração de RNA, a qual foi realizada utilizando kit de extração PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com seu respectivo protocolo.

3.7.8.2 Obtenção de cDNA

Após obtenção das amostras de RNA, a transcrição reversa foi realizada em um volume final de 20 μL , utilizando 10-13 μL de RNA total e 7-10 μL de 2 vezes RT Master Mix do Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA resultante desta reação foi quantificado para análise da razão de absorvância entre 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}), utilizando o NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific – NanoDrop products, Wilmington, Delaware, USA).

3.7.8.3 Quantificação da expressão dos genes relacionados ao melanoma

A expressão do genes relacionados ao desenvolvimento do melanoma foi quantificada através de PCR em tempo real em um equipamento 7500

Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e com o ensaio *ABI inventoried TaqMan® Gene Expression Assays*, cujos genes estão listados na tabela 1. Foi utilizado como volume final 20 µL. Para cada amostra analisada, foram utilizados 1 µL de *ABI inventoried TaqMan® Gene Expression Assays*, 10 µL de *TaqMan® 2 vezes PCR Master Mix* e 9 µL de Cdna a 20 ng/µL. As condições para amplificação foram: hold step 50 °C por 2 minutos, desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de um programa de dois passos (desnaturação à 95 °C por 15 segundos, e anelamento/extensão à 60 °C por 1 minuto).

Tabela 1. Genes relacionados ao desenvolvimento do melanoma avaliados por RT-PCR.

PRODUTO	Gene	Assay ID
Gene Exp assay (Small) – F2R	<i>PAR1</i>	Mm00438851_m1
Gene Exp assay (Small) – RHOA	<i>RHOA</i>	Mm00834507_g1
Gene Exp assay (Small) – GJA1	<i>CX-43</i>	Mm01179639_s1
Gene Exp assay (Small) – TFAP2A	<i>AP2α</i>	Mm00495574_m1
Gene Exp assay (Small) – MAPK1	<i>MAPK1</i>	Mm00442479_m1
Gene Exp assay (Small) – NFKB1	<i>NFKB1</i>	Mm00476361_m1
Gene Exp assay (Small) – PTAFR	<i>PAFR</i>	Mm02621061_m1
Gene Exp assay (Small) – VEGFA	<i>VEGFA</i>	Mm00437306_m1
Gene Exp assay (Small) – GAPDH	<i>GAPDH</i>	Mm99999915_g1
Gene Exp assay (Small) – ACTB	<i>ACTB</i>	Mm01205647_g1

3.7.9 Ensaio de crescimento tumoral *in vivo*

Para esse ensaio, camundongos C57BL/6 receberam uma injeção no flanco contendo 0,1 mL de células ($1,0 \times 10^5$ células B16F10), após antisepsia do local com álcool 70%. O grupo controle negativo não recebeu inoculação de

células tumorais e foi tratado com o placebo (PBS). Sete dias após a inoculação, os animais começaram a ser tratados com uma injeção intraperitoneal contendo sCS ou Heparina na dose de 300 µg/Kg/animal) ou com PBS estéril (controle positivo). Cada grupo foi composto por 10 animais, os quais foram tratados três vezes por semana durante um período de 25 dias. Após esse período, o sangue dos animais foi coletado para posterior dosagem de citocinas e os animais foram sacrificados. O tumor e pulmões de cada animal foram excisados e cada tumor foi submetido à pesagem e mensurações de suas dimensões. Posterior a isto, ambos tumores e pulmões foram divididos para análise histológica e da expressão gênica por RT-qPCR.

3.7.10 Dosagem de citocinas

O sangue dos animais submetidos ao ensaio de tumorigênese foi coletado em tubos de EDTA para obtenção do plasma. Em seguida, os níveis de citocinas interleucina 1-β (IL-1β) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) foram avaliados utilizando kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) (eBioscience) seguido pelo manual do fabricante. Adicionalmente, o sobrenadante das células tratadas com os compostos após 48h foi submetido à dosagem de TNF-α por ELISA. As amostras foram calculadas em quintuplicata e a densidade óptica de cada poço (ensaio realizado em placa de 96 poços inserida no kit) foi determinada a 570 e 450 nm. Os valores de absorvância de 570 nm foram subtraídos daqueles à 450 nm para posterior análise dos dados, de modo a diminuir os interferentes da leitura. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística.

3.7.11 Dosagem de VEGF

O sangue dos animais submetidos ao ensaio de tumorigênese foi coletado em tubos de EDTA para obtenção do plasma. Em seguida, os níveis do fator vascular de crescimento endotelial, do inglês vascular endothelial growth factor (VEGF) foram avaliados através de ELISA, seguido pelo manual do fabricante. As amostras foram calculadas em quintuplicata e a densidade óptica de cada poço (ensaio realizado em placa de 96 poços inserida no kit) foi determinada a 570 e 450 nm. Os valores de absorvância de 570 nm foram

subtraídos daqueles à 450 nm para posterior análise dos dados, de modo a diminuir os interferentes da leitura. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística.

3.7.12 Análise histológica dos tumores e pulmões de camundongos

Secções de tumores e pulmões excisados dos animais submetidos ao ensaio de tumorigênese, foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10%, desidratadas e embebidas em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos para coloração com hematoxilina-eosina (H&E) e examinadas por microscopia óptica (40 x, Nikon E200 LED). Três secções de tecido tumoral e pulmonar (seis animais por grupo) foram analisadas por dois patologistas. Nos fragmentos pulmonares, foram observadas quanto à ausência ou presença de células metastáticas. Nos fragmentos tumorais foram observadas a organização das células, estrutura tecidual e presença de vasos sanguíneos. Os achados histológicos foram expressos de forma descritiva.

3.7.13 Marcação de PAR-1 e VEGF por imuno-histoquímica dos tumores e pulmões de camundongos

Cortes finos de (4 µm) foram obtidos dos tumores e pulmões de cada grupo de animais (controle negativo, controle positivo, heparina e sCS) com um micrótomo e transferidos para lâminas revestidas com gelatina. Cada secção de tecido foi então desparafinizada e reidratada. As fatias de tumor e tecido pulmonar foram lavadas com Triton X-100 a 0,3% em tampão fosfato (PB) e incubadas com peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio a 3%). Em seguida, as secções de tecido foram incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos primários IGg (Abcam, CA, EUA) para anti-VEGF e anti-PAR-1 na diluição 1: 300, conforme recomendado pelo fabricante. Após período de incubação, as secções foram então lavadas com tampão fosfato e incubadas com um anticorpo secundário conjugado com estreptavidina / HRP (Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 30 minutos. A imunorreatividade às várias proteínas foi visualizada com um kit de detecção baseado em colorimetria seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (TrekAvidin-HRP Label + Kit da Biocare Medical, Dako, EUA). Por fim, as secções foram contra-coradas com

hematoxilina. Controles positivos e negativos conhecidos foram incluídos em cada conjunto de amostras. Para análise dos fragmentos de tumor, microscópio de luz (40x), (Nikon Eclipse 2000 equipado com Nikon DS-Fi2; Nikon Corporation, Tóquio, Japão) foi utilizado para pontuar a intensidade imunocoloração das células e o seguinte *score* foi aplicado: 1 = ausência de células positivas; 2 = pequeno número de células positivas ou células isoladas; 3 = número moderado de células positivas; e 4 = grande número de células positivas. A intensidade da marcação foi avaliada por dois examinadores previamente treinados, de maneira duplo-cega. Para análise dos fragmentos de pulmão, foram contadas áreas de células marcadas com o auxílio do programa *ImageJ Pro-Plus*. Os resultados foram expressos como média \pm DP (desvio padrão) ou média \pm SEM (erro médio padrão) e analisadas por ANOVA. Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Bonferroni. Foram considerados significativamente diferentes os valores a partir de $p < 0,05$.

3.8 Análise Estatística

Os resultados foram expresso como média \pm DP (desvio padrão) ou média \pm SEM (erro médio padrão) e analisadas por ANOVA. Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Bonferroni ou *t-test* (análise da expressão gênica). Foram considerados significativamente diferentes os valores a partir de $p < 0,05$.



RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 Purificação do composto tipo CS a partir do camarão *L. vannamei*

Os GAGs isolados do cefalotórax do camarão após proteólise e complexação com resina de troca-iônica foram eluídos com NaCl 3,0M para obtenção de um extrato bruto de polissacarídeos que foi denominado de fração F-3,0M. Após o tratamento da F-3,0M com proporções crescentes de acetona, obtiveram-se quatro populações polissacarídicas, as frações F-0,5A, F-0,7A, F-1,0A e F-2,0A (Tabela 2). Embora a F-1,0A apresente um menor rendimento, essa fração foi escolhida para posterior purificação, devido ao fato de que, anteriormente já foram isolados do camarão *Litopenaeus vannamei* um heparinoide da fração 0,5A (BRITO, et. al., 2008), um condroitim sulfato (CAVALCANTE et. al., 2018) e um composto híbrido de heparina/heparim sulfato (Hep/HS) da fração 0,7A (BRITO, et. al., 2014). Além disso, a F-2,0A apresentou baixo rendimento e não pôde ser utilizada.

A análise dessas frações por eletroforese em gel de agarose, no sistema PDA, revelou que todas apresentam uma banda com perfil de migração semelhante à Hep/HS, indicando a presença de heparinoides. Além da presença destes análogos de Hep/HS, as frações F-1,0A e F-2,0A também apresentam compostos com um perfil de migração semelhante a dermatam/condroitim sulfato (CS/DS) (Dados não mostrados).

Tabela 2: Rendimento das frações obtidas a partir da F-3,0M, após fracionamento com acetona. *Os valores entre parênteses representam o rendimento percentual em relação ao total das massas obtidas no fracionamento com acetona.

Cabeças (Kg)	Pó cetônico (g)	F-3,0M (g)	Frações Obtidas por Tratamento com Acetona (mg)			
			F-0,5A	F-0,7A	F-1,0A	F-2,0A
16,3	1.520,0	2,0353	85,0* (11,47%)	358,0* (48,3%)	192,3* (25,94%)	105,9* (14,29%)

Após eluição da F-1,0A em cromatografia de troca-iônica DEAE-Sephacel, os GAGs presentes em cada subfração foram quantificados pela dosagem de ácido urônico. Apesar da subfração eluída com NaCl 0,8M ter mostrado 68,18% de teor de urônico, essa fração não apresentou uma única banda de separação, sugerindo a presença de outras populações de GAGs. Dentre as subfrações obtidas, a F-1,0, apresentou uma banda homogênea com um perfil de migração eletroforético próximo ao DS, caracterizando uma população de GAGs aparentemente isolada dos demais GAGs. O perfil de migração eletroforética entre HS e DS apresentado pela subfração F-1,0, despertou o nosso interesse em caracterizar a sua estrutura e estudar algumas propriedades desse GAG. Portanto, a fração foi liofilizada e seu sal removido por meio de cromatografia de gel filtração (Sephadex G-25) e submetido às análises subsequentes.

4.2 Caracterização estrutural

4.2.1 Determinação do peso molecular e da composição dissacarídica do CS de *L. vannamei*

Em um momento anterior, o composto do presente estudo foi submetido à degradação enzimática com liases do tipo condroitinases AC e ABC, contudo o mesmo pareceu ser resistente à ação de AC, tendo sido digerido parcialmente pela condroitinase ABC e por isso, foi-se especulado inicialmente que se tratava de um GAG de natureza do tipo Dermatan sulfato (PALHARES, 2016). Entretanto, a realização de um tratamento com um novo lote de condroitinases AC e ABC, revelou a suscetibilidade do CS de camarão à ação conjunta dessas enzimas. Desta forma, a composição dissacarídica do composto do camarão foi determinada por degradação enzimática exaustiva com uma mistura de liases do tipo condroitinase ACII e ABC. OS produtos obtidos foram constituídos de 25,9% do dissacarídeo não-sulfatado Δ U-GalNAc e 74,1% de dissacarídeos contendo grupamento sulfato nas posições 4 ou 6 e ambos 4,6 (Δ U-GalNAc-4-O-sulfato; Δ U-GalNAc-6-O-sulfato e Δ U-GalNAc-4,6 di-O-sulfato, respectivamente) (Fig. 5). Embora a presença de proporções

significativas do dissacarídeo Δ U-GalNAc-4,6 di-O-sulfato exibidas pela análise de HPLC inicialmente sugerisse uma estrutura do tipo CS-E, uma análise mais refinada realizada por RMN, evidenciou outras estruturas e estas foram investigadas mais adiante. Assim, a partir deste momento o composto isolado do camarão passou a ser denominado sCS (shrimp CS).

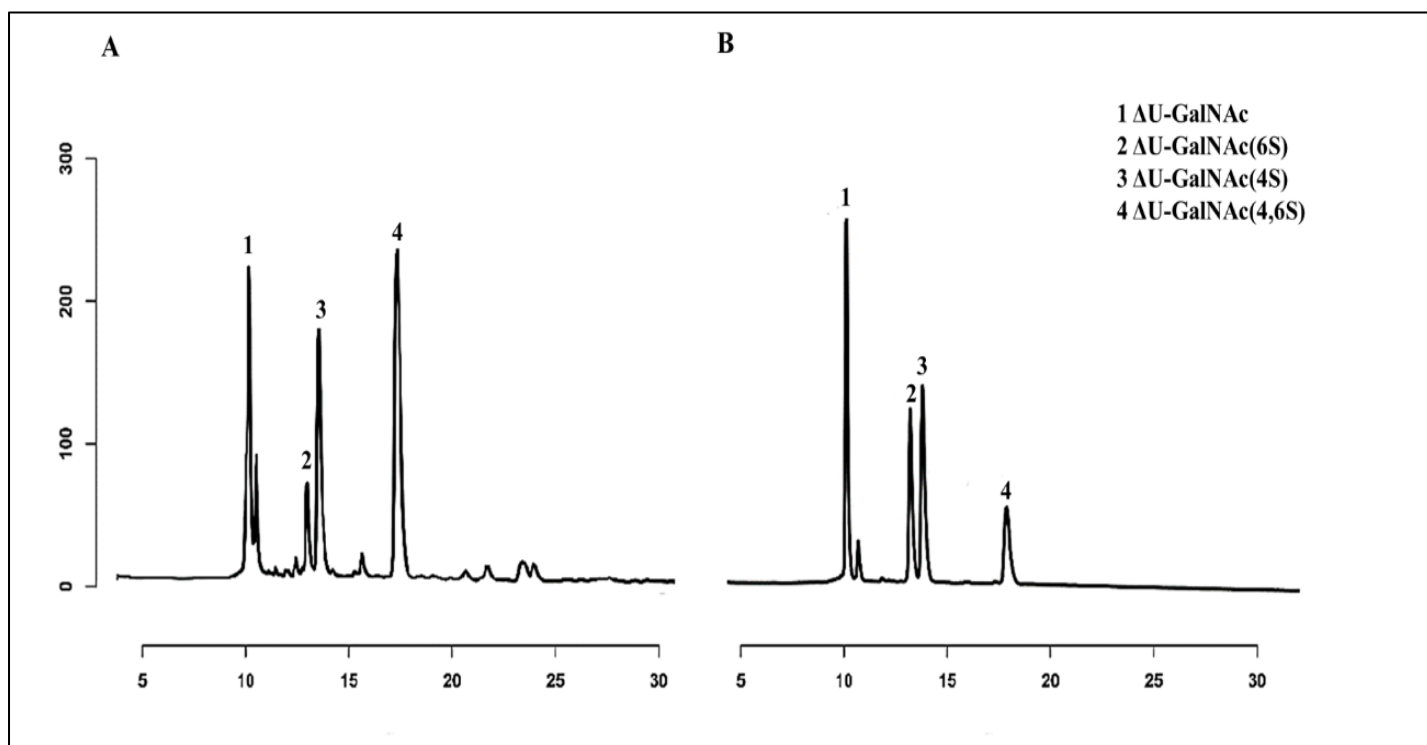


Figura 5. A análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) dos dissacarídeos formados após digestão do CS de camarão pelas condroitinases ACII e ABC. (A) Padrões dissacarídicos e (B) dissacarídeos formados pela ação exaustiva das condroitinases AC II e ABC sobre o condroitim sulfato de *L. vannamei*, foram aplicados a uma coluna 150x4.6 mm Phenosphere – SAX, ligado a um sistema de HPLC. A coluna foi eluída com um gradiente de NaCl tal como descrito na metodologia. O eluente foi monitorado por absorvância de UV a 232 nm.

4.2.2 Determinação da composição monossacarídica do CS de *L. vannamei*

A caracterização estrutural do sCS por RMN foi realizada utilizando uma combinação de técnicas de espectroscopia unidimensional (^1H -RMN e ^{13}C -RMN), bidimensional homonuclear (COSY, TOCSY e NOESY) e bidimensional heteronuclear (HSQC e HMBC), os quais permitiram detectar e atribuir os sinais de correlação do espectro para todas as variantes estruturais (Tabela 3). As atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C no espectro bidimensional (^1H - ^{13}C HSQC

bidimensionais) e o mapa de deslocamento químico dos átomos são mostrados na Fig. 6. Oito variantes estruturais foram caracterizadas a partir das atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C para monossacarídeos constituintes aqui denominadas: GlcA, GlcA-3Si, GlcA-3Sii, GalNAc4Si, GalNAc-4Sii, GalNAc-6Si, Gal-NAc-6Sii e GalNAc-4,6S (Fig. 6), onde ' S ' representa O-sulfato e os subscritos i e ii denotam sinais do mesmo tipo de resíduo, mas em ambientes ligeiramente diferentes (provavelmente resíduos adjacentes distintos). As ligações do tipo GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc são evidentes em ambos os espectros $^1\text{H} / ^1\text{H}$ NOESY e $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ HMBC (Fig. 4, 5 e 6) e revelam quatro variantes de dissacarídeos dissulfatados e trissulfatados; GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-4,6S, GlcA-3Si $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-4Si, GlcA-3Si $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-4Sii, GlcA-3Si $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-4,6S and GlcA-3Sii $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-6Si. Também foram observadas nos espectros $^1\text{H} / ^1\text{H}$ NOESY e $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ HMBC ligações entre GalNAc-4Si e GlcA, GalNAc-4Sii e GlcA-3Si, GalNAc-4,6S e GlcA-3Sii, GalNAc-6Si e GlcA e GalNAc-6Sii e GlcA. O resíduo incomum GlcA-3S foi identificado através de padrões característicos de alterações químicas de acordo com a literatura (USTYUZHANINA et al., 2016).

Tabela 3. Atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C do espectro de RMN HSQC para o sCS obtido de *Litopenaeus vannamei* (Valores em ppm à 70 °C).

Resíduo		1	2	3	4	5	6	-COCH ₃
GlcA	^1H	4.467	3.388	3.570	3.788	3.704	---	---
	^{13}C	106.681	75.367	76.846	83.749	79.557	---	---
GlcA-3Si	^1H	4.589	3.647	4.376	4.048	3.773	---	---
	^{13}C	106.637	75.301	84.947	80.998	80.025	---	---
GlcA-3Sii	^1H	4.551	3.625	4.372	4.052	3.829	---	---
	^{13}C	106.506	75.301	84.269	79.993	79.988	---	---
GalNAc-4Si	^1H	4.596	3.991	3.996	4.727	3.803	3.834	3.759
	^{13}C	104.028	54.773	79.347	79.429	77.665	64.173	64.151
GalNAc-4Sii	^1H	4.633	4.034	3.986	4.757	3.736	3.785	3.730
	^{13}C	104.295	54.695	79.724	79.361	77.595	64.147	64.100
GalNAc-6Si	^1H	4.547	3.987	3.804	4.126	4.031	4.207	4.167
	^{13}C	104.109	54.018	83.825	70.572	78.692	70.391	70.400
GalNAc-6Sii	^1H	4.577	3.996	3.692	4.136	4.076	4.269	4.208
	^{13}C	104.503	54.001	77.909	70.232	75.566	70.905	70.837
GalNAc-4,6S	^1H	4.671	4.007	4.006	4.778	3.962	4.268	4.241
	^{13}C	103.223	54.734	79.114	79.480	75.405	70.120	70.078

¹Valores combinados para os sinais denominados *i* e *ii* no espectro do HSQC (Figura 6).

Não foram identificados sinais correspondentes aos dissacarídeos contendo GlcA-2,3S, distinguindo essas cadeias das anteriormente isoladas de outra subfração de sCS (CAVALCANTE et. al., 2018), revelando uma estrutura peculiar para essa forma de sCS, o que pode justificar as diferentes atividades biológicas para cada forma de cadeia. Além disso, também não foram identificados sinais correspondentes à presença de IdoA, ratificando que não se trata de um composto tipo Dermatan sulfato. As proporções para cada um dos cinco resíduos constituintes identificados foram determinadas a partir do espectro $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ HSQC. A integração dos principais sinais anoméricos (entre 4,4-4,7 ppm em ^1H e 102-108 ppm na dimensão ^{13}C) indicou a seguinte composição para o sCS: 40,4% de GlcA, 59,6% de GlcA-3S, 46,2% de GalNAc-4S, 2,5% de GalNAc-6S e 28,3% de GalNAc-4,6-diS.

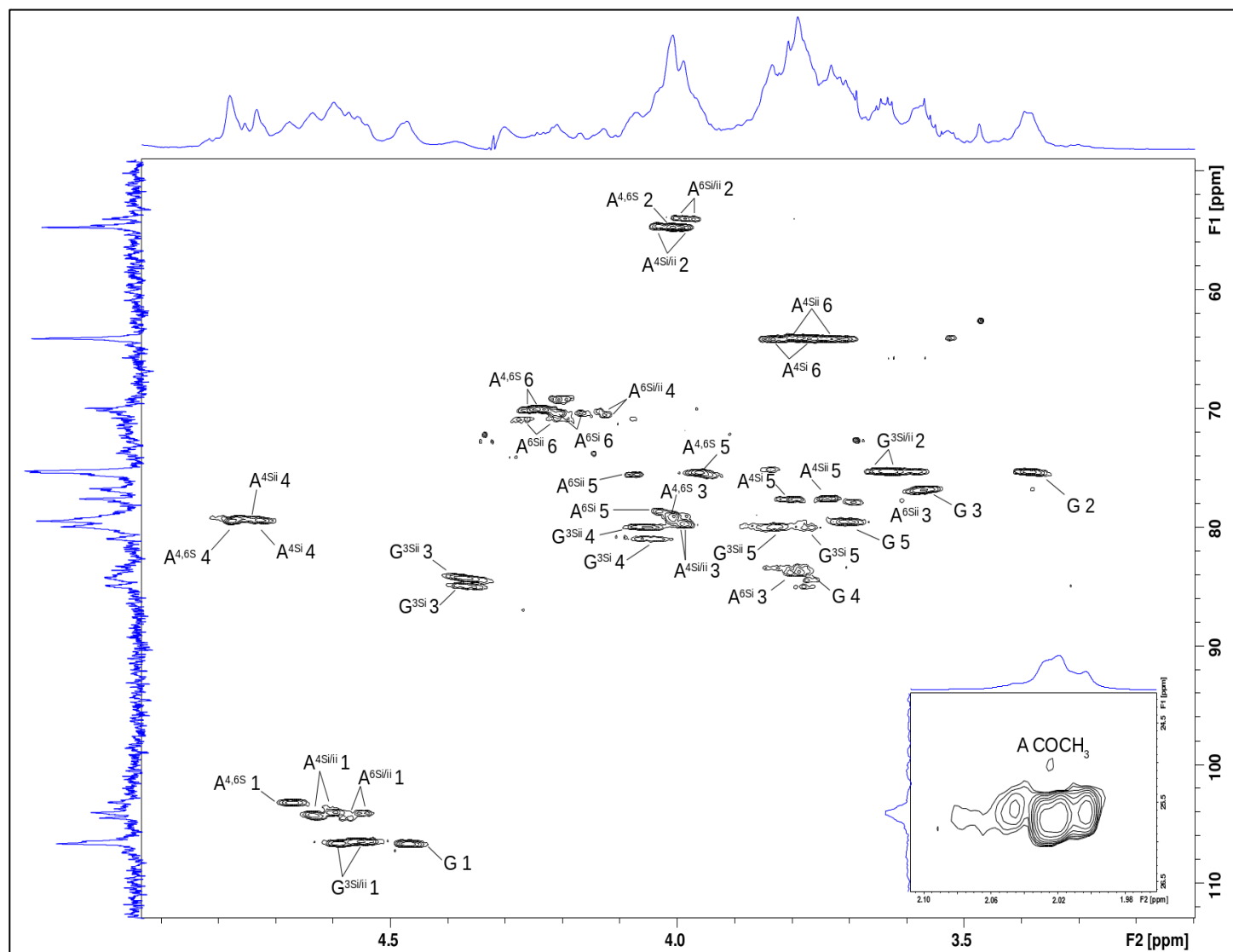


Figura 6. Espectro de RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC do sCS com projeções externas 1-dimensionais ^1H e ^{13}C obtidas à 600MHz em D_2O à 343K e referidas à $100\mu\text{M}$ DSS. A letra G representa ácido glucurônico e os grupos 3-O-sulfato são indicados por 3S, enquanto a letra A (aminoacúcar) representa N-acetil D-galactosamina com grupos 4-O-, 6-O- e 4,6 di-O-sulfato, indicados por 4S, 6S e 4,6S respectivamente. *i* e *ii* representam o mesmo tipo de resíduo com diferentes resíduos vizinhos.

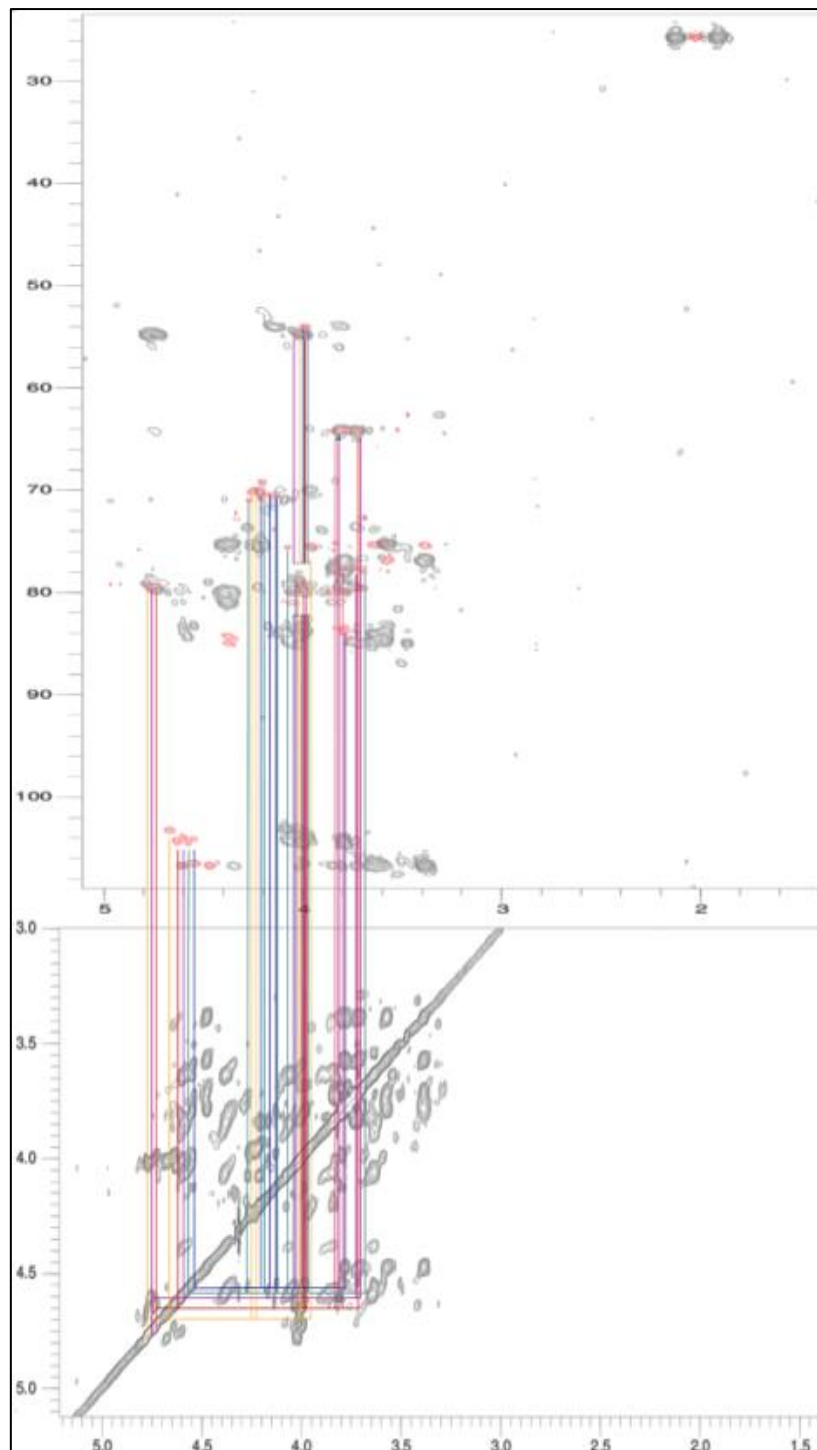


Figura 7. Espectros sobrepostos de HSQC (vermelho) e HMBC (preto), acima, e espectro de TOCSY, abaixo, amostrando as conexões presentes dentro os resíduos de N-Acetilgalactosamina. As linhas amarelas mostram conexões visíveis para N-Acetilgalactosamina 4,6-O-sulfato, $A^{4,6S}$, com linhas vermelha e azul indicando N-Acetilgalactosamina 4-O-sulfato, A^{4Si} e A^{4Sii} respectivamente, e linhas ciano e azul indicando N-Acetilgalactosamina 6-O-sulfato, A^{6Si} e A^{6Sii} respectivamente.

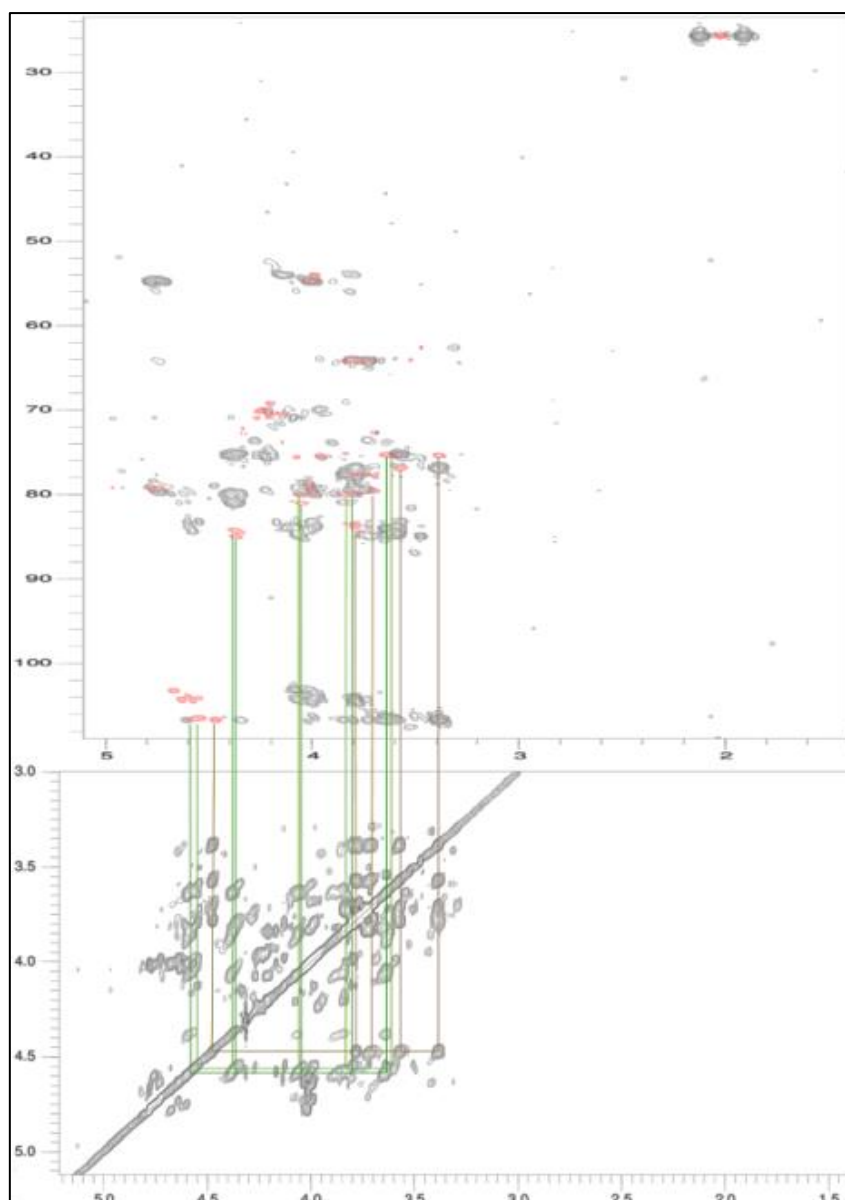


Figura 8. Espectros sobrepostos de HSQC (vermelho) e HMBC (preto), acima, e espectro de TOCSY, abaixo, mostrando as conexões presentes dentre os resíduos de ácido glucurônico. Linhas marrom indicam as conexões visíveis para o ácido glucurônico, G, com linhas verdes escuras e claras indicando ácido glucurônico 3-O-sulfato, G3^{Si} e G3^{Sii} respectivamente.

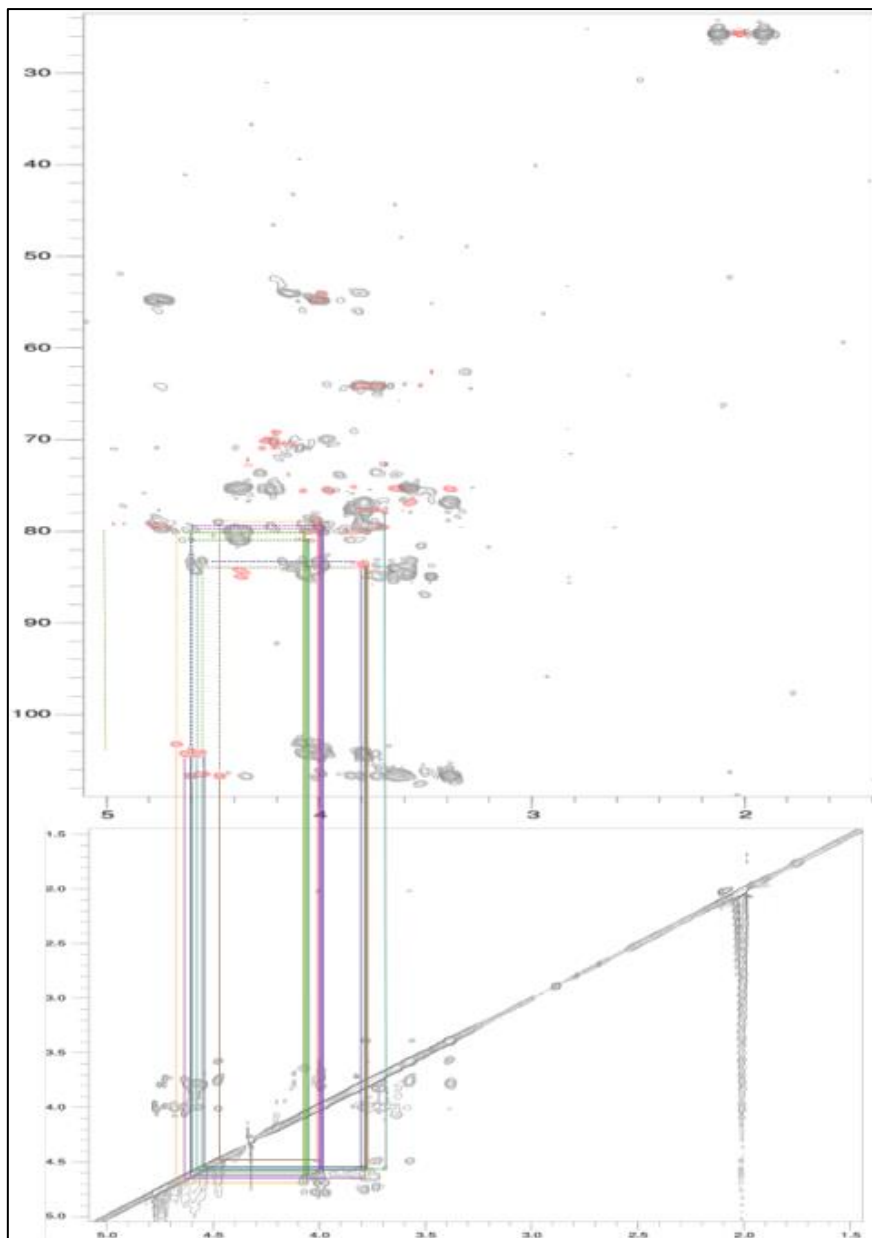


Figura 9. Espectros sobrepostos de HSQC (vermelho) e HMBC (preto), acima, e espectro de TOCSY, abaixo, mostrando as conexões presentes entre os resíduos de ácido glucurônico e N-Acetilgalactosamina. As cores apresentadas são conforme as figuras 4 e 5 com as linhas sólidas indicando as ligações estabelecidas através do experimento de NOESY e linhas tracejadas através de HMBC.

4.3 Avaliação do efeito anti-melanoma *in vitro* do sCS

4.3.1 Efeito do cCS sobre a viabilidade, ciclo celular e apoptose de células de melanoma B16F10

Afim de investigar se a heparina ou o sCS eram capazes de produzir algum efeito citotóxico sobre as células de melanoma, as células B16F10 foram cultivadas na presença dos GAGs em questão (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 24 h, a 37°C e 5% de CO_2 . Após o tratamento, a viabilidade celular foi investigada pelo método do Alamar Blue®. Como pode ser observado na Figura 10, nenhuma das concentrações testadas dos compostos foi capaz de reduzir de forma significativa a viabilidade das células tumorais. Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos e as células cultivadas apenas com meio de cultura, sugerindo assim que ambos os compostos não induzem toxicidade celular sobre as células de melanoma.

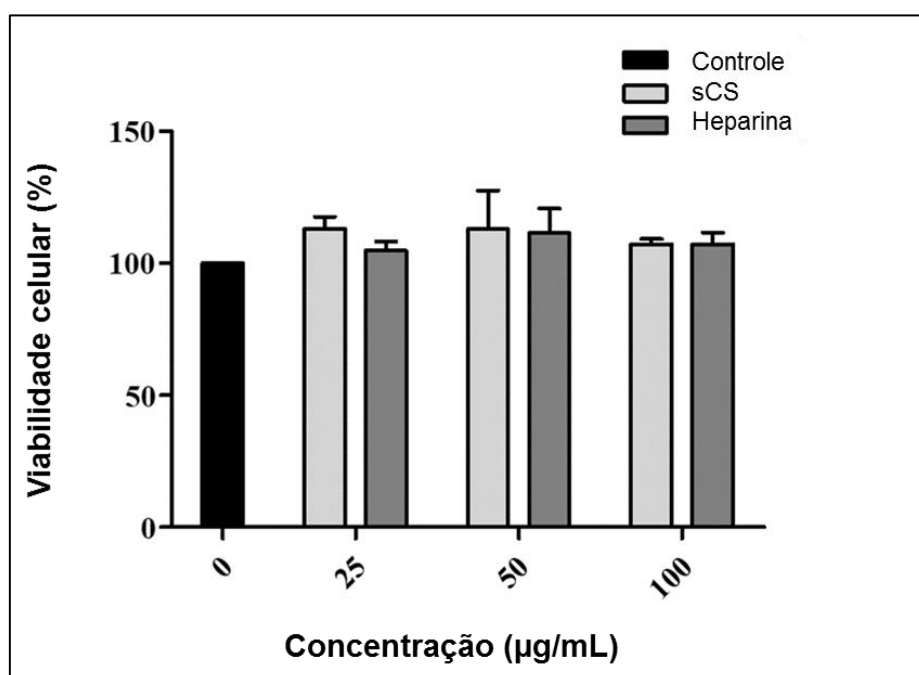


Figura 10: Avaliação do efeito do sCS e heparina sobre a viabilidade de células de melanoma. Células B16F10 foram cultivadas e tratadas com 100 μL de meio suplementado contendo diferentes concentrações de heparina ou sCS. Após 24 h de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do Alamar Blue®. Os valores foram expressos em porcentagem de redução do Alamar em relação ao grupo controle, onde as células não receberam tratamento.

Uma vez que o método de Alamar Blue® permite verificar o efeito de compostos sobre as células de forma indireta, uma análise por citometria de fluxo foi também realizada no intuito de verificar se os GAGs eram capazes de induzir algum evento apoptótico ou necrótico sobre as células de melanoma. Para tal, foi realizada uma marcação dupla usando anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP). Durante o estágio inicial da apoptose, as células exibem fosfatidilserina em suas membranas celulares externas, o qual é prontamente detectável usando a anexina V. Durante os estágios posteriores da apoptose, à medida que a membrana plasmática se torna cada vez mais permeável, o IP pode mover-se através da membrana celular para então se ligar ao DNA celular. Assim, uma dupla coloração das células com Anexina V e IP permite detectar células apoptóticas por citometria de fluxo. A maior concentração de heparina ou sCS (100 µg/mL) não induziu efeito apoptótico nas células, bem como não foi capaz de induzir qualquer modulação no ciclo celular (Fig. 11).

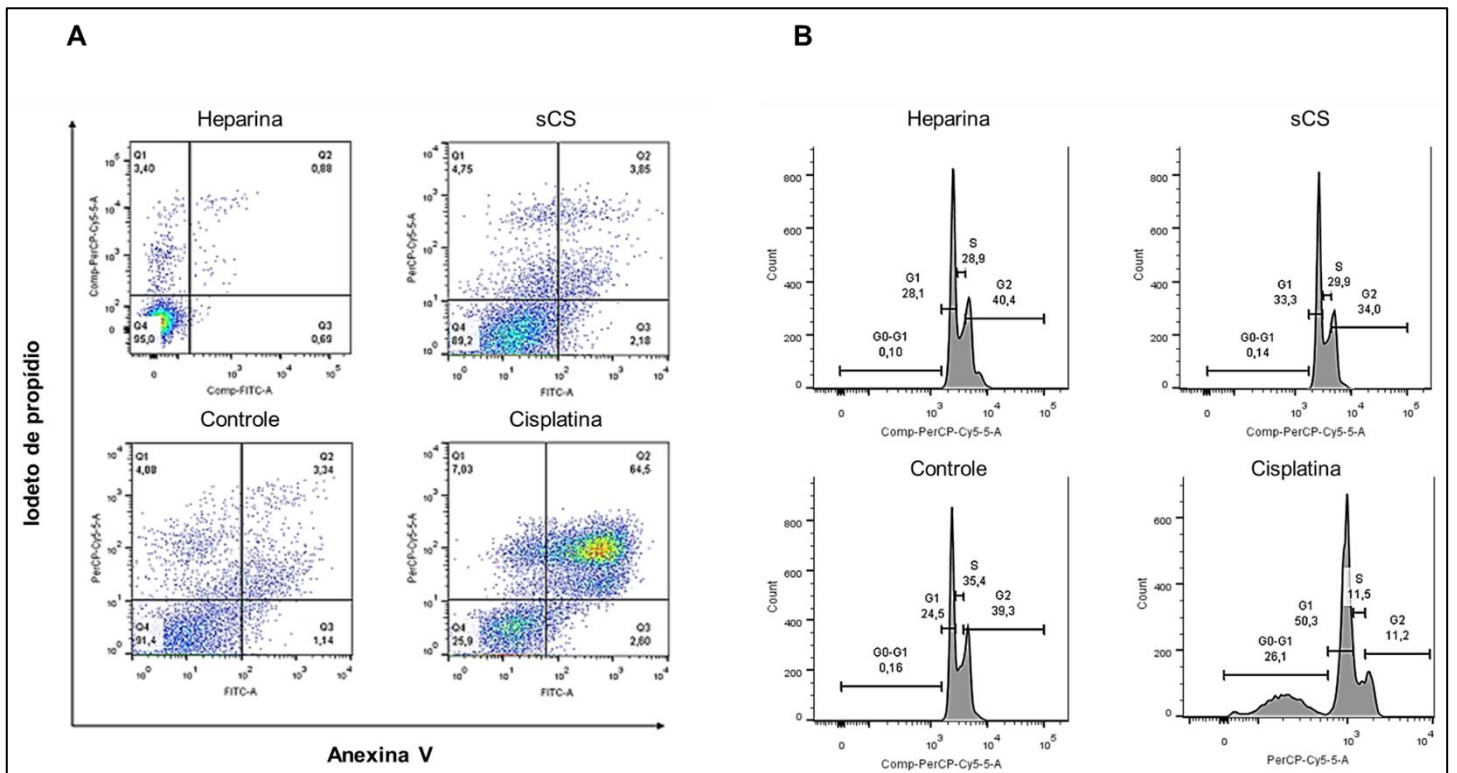


Figura 11. Efeito do sCS e heparina sobre a indução de apoptose e sobre o ciclo celular de células B16F10. As células de melanoma B16F10 expostas aos GAGs na concentração de 100 µg/mL. O Ensaio de morte celular por apoptose foi realizado através da marcação das células com anexina V/iodeto de propídio (A) e a análise do ciclo celular é representada por histogramas que mostram a porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular (B). Ambos experimentos foram analisados por citometria de fluxo. Controle representa as células incubadas somente com meio de cultura, enquanto que a Cisplatina foi utilizada como controle

positivo, por induzir morte celular e alteração de ciclo celular. Os dados representam a média \pm SE de três experimentos independentes.

4.3.2 Efeito do sCS sobre a clonogenicidade das células de melanoma B16F10

O ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico, tem como objetivo investigar a ação dos compostos sobre a formação de clones a partir de uma única célula tumoral. Para isso, células B16F10 foram cultivadas durante 10 dias na presença ou ausência de diferentes concentrações de heparina ou sCS (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Como observado na Figura 12, tanto a heparina como o sCS limitaram de maneira significativa a clonogenicidade das células de melanoma em todas as concentrações analisadas ($p < 0,001$), sendo observada uma inibição dependente de concentração. Quando comparado à heparina, o sCS exibe um efeito maior, especialmente na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, promovendo uma redução de 75% em relação ao controle, sobre a área de crescimento das colônias, enquanto a redução promovida pela heparina, nessa mesma concentração, foi de 61%. Esses resultados demonstram que, em longo prazo, o CS isolado do camarão apresenta um importante efeito de inibição da formação de colônias, o que pode sugerir um uma ação antiproliferativa sobre as células de melanoma.

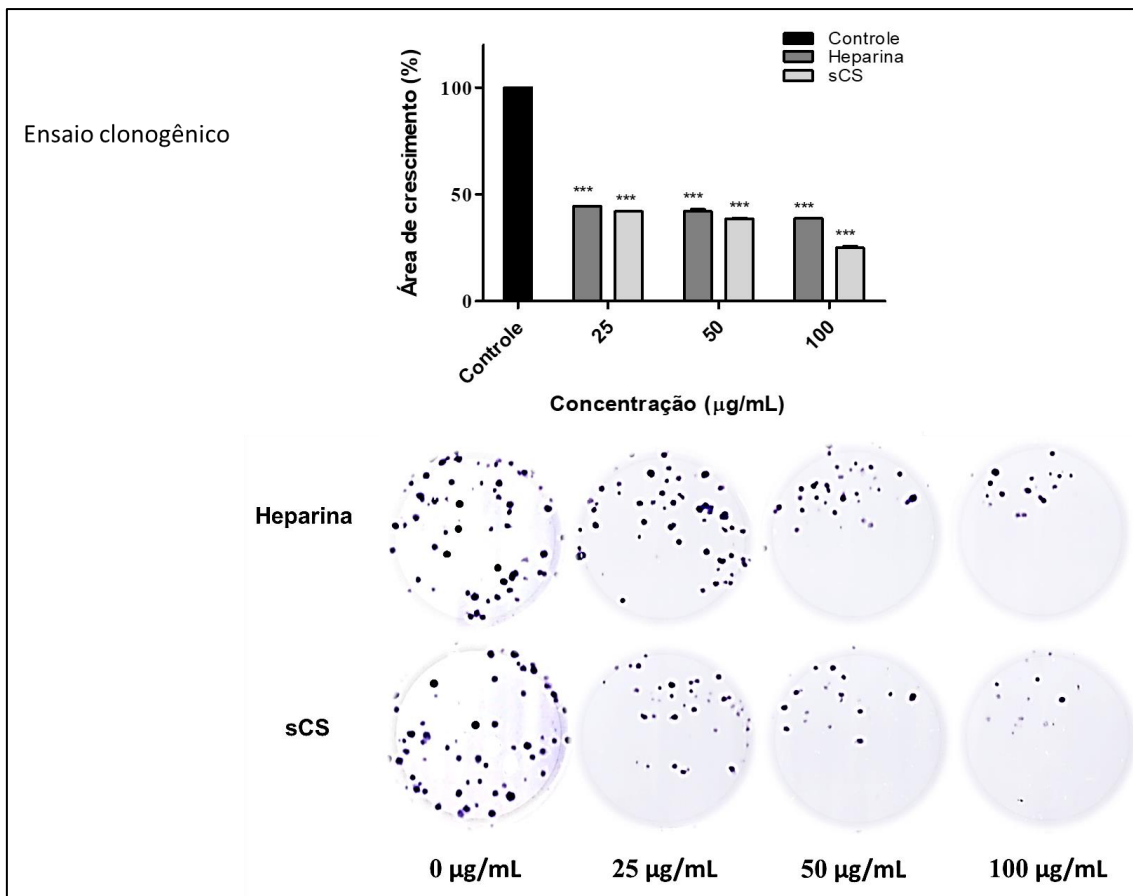


Figura 12. Efeito do sCS e heparina sobre a capacidade de formação de colônia (clonogenicidade) de células B16F10. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade de 100 células/poço. Após um período de 3h, as células foram tratadas com heparina ou sCS e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ durante 10 dias. A cada três dias o meio foi trocado e foi adicionado novo meio contendo as amostras. Após o tempo de incubação, as colônias formadas foram lavadas, fixadas, coradas e fotografadas. A área das colônias foi quantificada utilizando o software Image J (A) Imagens das colônias formadas após serem coradas. (B) Os resultados foram expressos em porcentagem da área de crescimento das colônias no poço levando em consideração o grupo controle (sem tratamento). ***p<0,001 indica diferença estatística em relação ao controle.

4.3.3 Efeito do sCS sobre a proliferação independente de ancoragem das células de melanoma B16F10

Outra característica importante do potencial maligno de células tumorais é a proliferação celular independente de ancoragem, ou seja, na ausência de um substrato sólido para adesão das células. A fim de investigar se o sCS é capaz de inibir esse processo, células B16F10 foram cultivadas em meio de cultura contendo agarose a 0,5%, na presença de sCS, durante 10 dias. Quando comparado ao controle, é evidente a redução do crescimento celular

quando as células são tratadas com o sCS. Na concentração de 100 µg/mL de sCS o crescimento de colônias foi de apenas 19%, representando uma redução de 81% ($p < 0,001$) na proliferação das células tumorais (Fig.13). Resultado semelhante ocorreu na concentração de 50 µg/mL, na qual o sCS já apresenta uma inibição de cerca de 70%, enquanto que na concentração de 25 µg/mL o potencial de inibição foi de cerca de 60%.

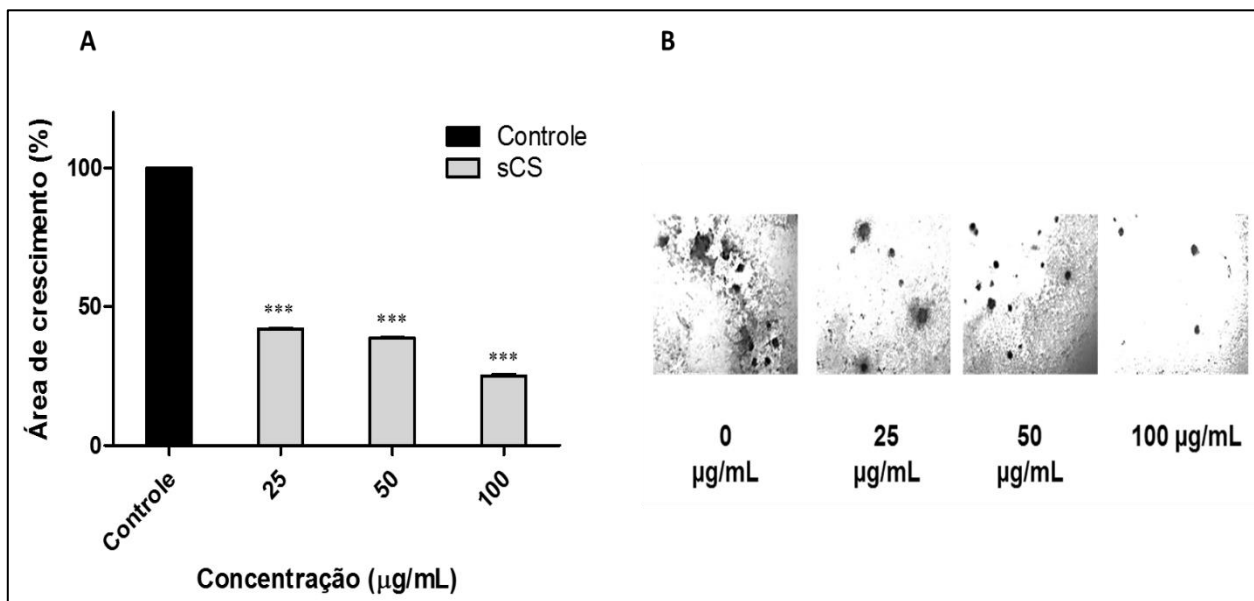


Figura 13. Efeito do sCS sobre a capacidade de proliferação independente de ancoragem das células B16F10. Células B16F10 ($1,0 \times 10^3$ células/poço) foram cultivadas em meio contendo 0,5% de agarose, na presença ou ausência (controle) de sCS. A cada três dias o meio foi trocado e foi adicionado um novo meio contendo as amostras. As colônias multicelulares formadas foram analisadas e fotografadas após 10 dias de cultivo. A área das colônias foi quantificada utilizando o software Image J **(A)** Imagens representativas das colônias. Escala: 100 µm. **(B)** Área das colônias formadas expressa em porcentagem do controle (grupo sem tratamento). *** $p < 0,001$ indica diferença estatística em relação ao controle.

4.3.4 Efeito do sCS sobre a migração de células de melanoma B16F10

A capacidade de migração e invasão de tecidos adjacentes e vasos sanguíneos, favorecem o processo de metástase, sendo uma importante característica de células tumorais com alto grau de malignidade (BROOKS et al., 2010). Por essa razão, foi investigada a habilidade do sCS de inibir a migração de células de melanoma através dos ensaios de preenchimento da fenda (wound healing assay) e *transwell assay*. Neste último, a migração das células foi estimulada pela fibronectina. Quando comparado ao controle, onde

as células não foram tratadas com os compostos, sCS foi capaz de inibir a migração das células através das câmaras de *transwell* em todas as concentrações testadas, de maneira dependente de concentração, alcançando uma redução de 70% da migração na maior concentração analisada. A heparina apresentou efeito mais proeminente na concentração de 100 µg/mL, onde limitou a migração das células tumorais em 41% quando comparado ao controle, representando 60% de inibição (Fig. 14). Resultado semelhante foi exibido no ensaio de preenchimento da fenda. Após 48h foi possível observar que o sCS inibiu aproximadamente 24 e 52% nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, respectivamente, atingindo 66% da inibição da migração celular na concentração de 100 µg/mL. A heparina apresentou um efeito mais significativo ($p < 0,01$) na concentração de 100 µg/mL, onde atingiu 52% de inibição (Fig.15).

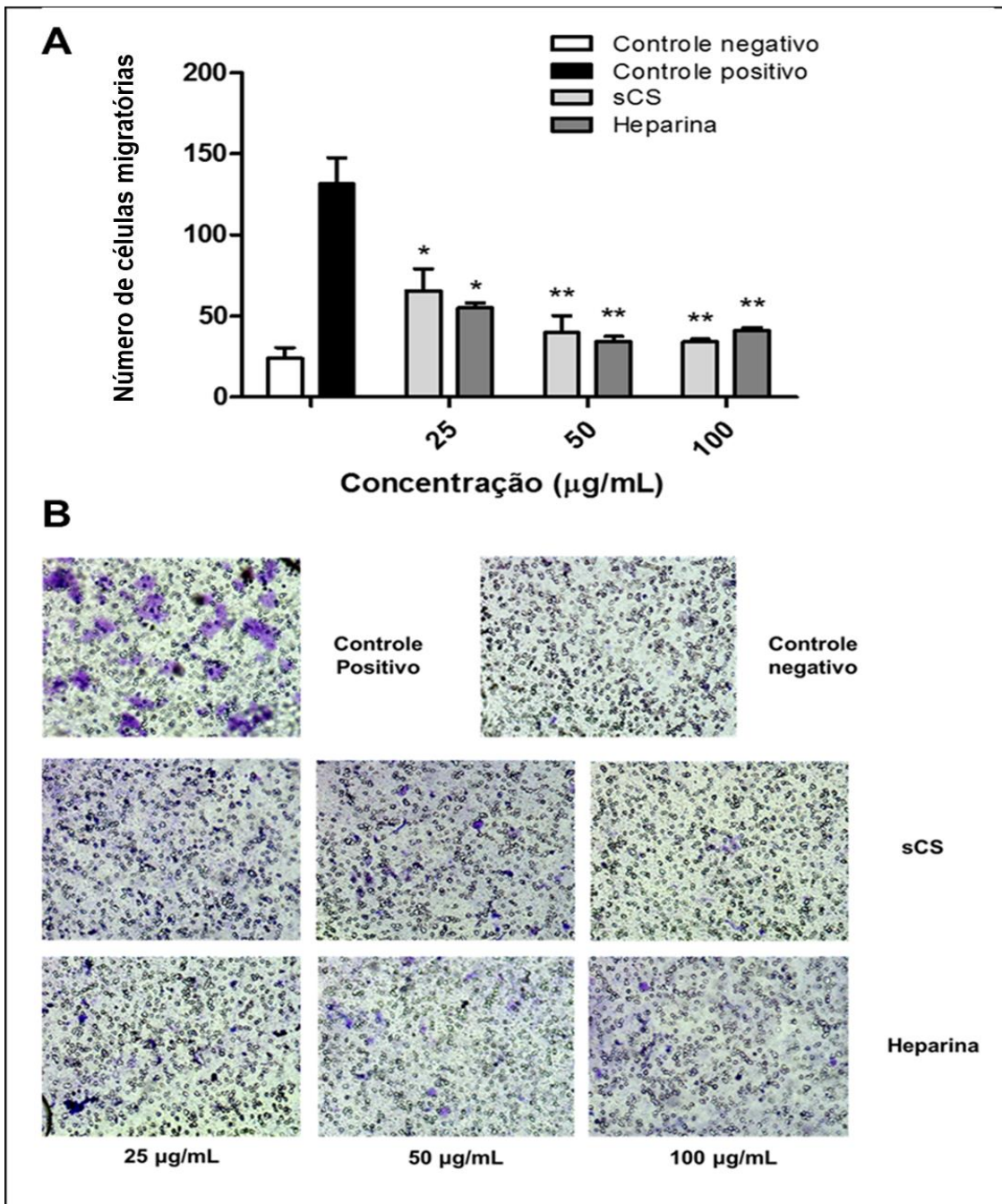


Figura 14. Efeito do sCS e heparina na migração de células tumorais B16F10 no ensaio de reparo da fenda (*wound healing assay*). Células B16F10 foram plaqueadas em um inserto de transwell e meio de cultura contendo diferentes concentrações (25, 50 e 100 µg/ml) do sCS ou heparina foi adicionado. Fibronectina foi adicionada no compartimento inferior ao inserto, afim de criar um gradiente de concentração. Após 4h as células que migraram foram coradas, fotografadas e quantificadas utilizando o software Image J **(A)**. Imagens representativas das células que migraram através do transwell. Escala: 100 µm. **(B)** Número de células que migraram expresso em porcentagem do controle positivo (grupo sem tratamento com estímulo para migração). *** $p < 0,001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ indicam diferença estatística em relação ao controle.

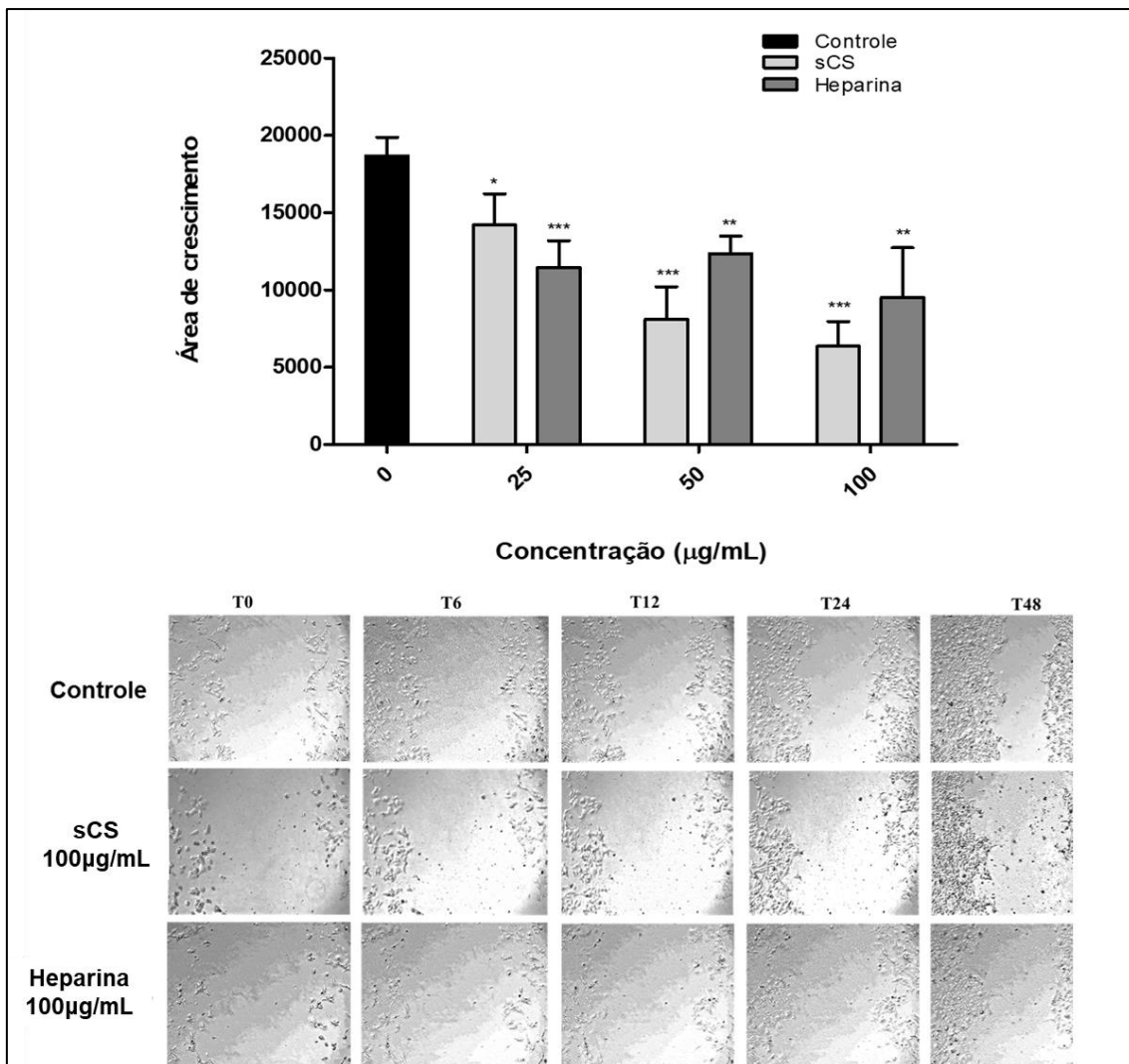


Figura 15. Efeito do sCS e heparina na migração de células tumorais B16F10 em ensaio *transwell*. Células B16F10 foram cultivadas em placa de 24 poços e uma fenda foi realizada com auxílio de um ponteira. Em seguida, foi adicionado meio de cultura contendo diferentes concentrações (25, 50 e 100 µg/ml) do sCS ou heparina. A migração celular foi acompanhada e fotografias foram realizadas automaticamente por um microscópio óptico nos tempos de 6, 12, 24 e 48h após a raspagem das células. A área de migração foi quantificada utilizando o software Image J (A). Imagens representativas das células que migraram através da fenda. Escala: 100 µm. (B) Número de células que migraram expresso em porcentagem em relação ao controle positivo (grupo sem tratamento com estímulo para migração). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ and * $p < 0,05$ indicam diferença estatística em relação ao controle.

4.3.5 Efeito do sCS na expressão de genes relacionados ao melanoma pelas células B16F10

O sucesso do desenvolvimento tumoral no melanoma é ditado por um conjunto de genes específicos que desempenham um papel importante na progressão do melanoma, em especial o gene do receptor de trombina PAR-1. Assim, no intuito de entender como o sCS é capaz de modular essas

atividades, importantes na progressão do melanoma, foi analisada a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do melanoma pelas células B16F10, através de RT-qPCR. Após 48h de tratamento das células com sCS ou heparina, foi possível observar uma diminuição significativa da expressão de todos os genes, com exceção do gene AP-2 α . O sCS mostrou efeito mais significativo ($p < 0,01$) na diminuição dos níveis de expressão do gene Cx-43 (Fig. 16). Sua expressão está intimamente relacionada com o desenvolvimento de todos os subtipos de melanoma e o aumento da sua expressão neste tipo de tumores está relacionado ainda com a regulação de outros genes cruciais para a progressão tumoral do melanoma como o AP-2 α e PAR-1, formando uma tríade de regulação transcricional importante no melanoma (VILLARES, ZIGLER & BAR-ELI, 2011).

Quando comparado com a heparina, o sCS foi capaz de diminuir os níveis da expressão do gene responsável pela angiogênese, o VEGFA, de forma mais proeminente ($p < 0,05$ vs $p < 0,01$), enquanto que para o gene PAFR (responsável pela ativação plaquetária), a heparina mostrou maior efeito sobre seus níveis de expressão do que o sCS ($p < 0,01$). Além disso, ambos os compostos foram capaz de modular a expressão do gene MAPK. Porém, apenas o sCS mostrou efeito inibitório significativo sobre a expressão do gene RhoA ($p < 0,05$). MAPK e RhoA, são proteínas quinases que constituem importantes vias de sinalização relacionadas à proliferação, migração e adesão celular, as quais podem ser reguladas por PAR-1 (COUGHLIN, 2000). O sCS exibiu ainda evidente modulação ($P < 0,05$) sobre a expressão do gene NFKB1, enquanto que a heparina não apresentou nenhum efeito inibitório significativo.

O NFKB1 tem como produto o NF- $\kappa\beta$, o qual é um fator transcricional de suma importância na resposta inflamatória, a qual está atrelada não somente aos estágios iniciais da tumorigênese, bem como à progressão tumoral. Assim, a habilidade do sCS em modular a expressão de genes importantes no desenvolvimento do melanoma, sugere um potencial anti-melanoma *in vitro* à nível molecular, ainda em um curto período de tratamento (24h).

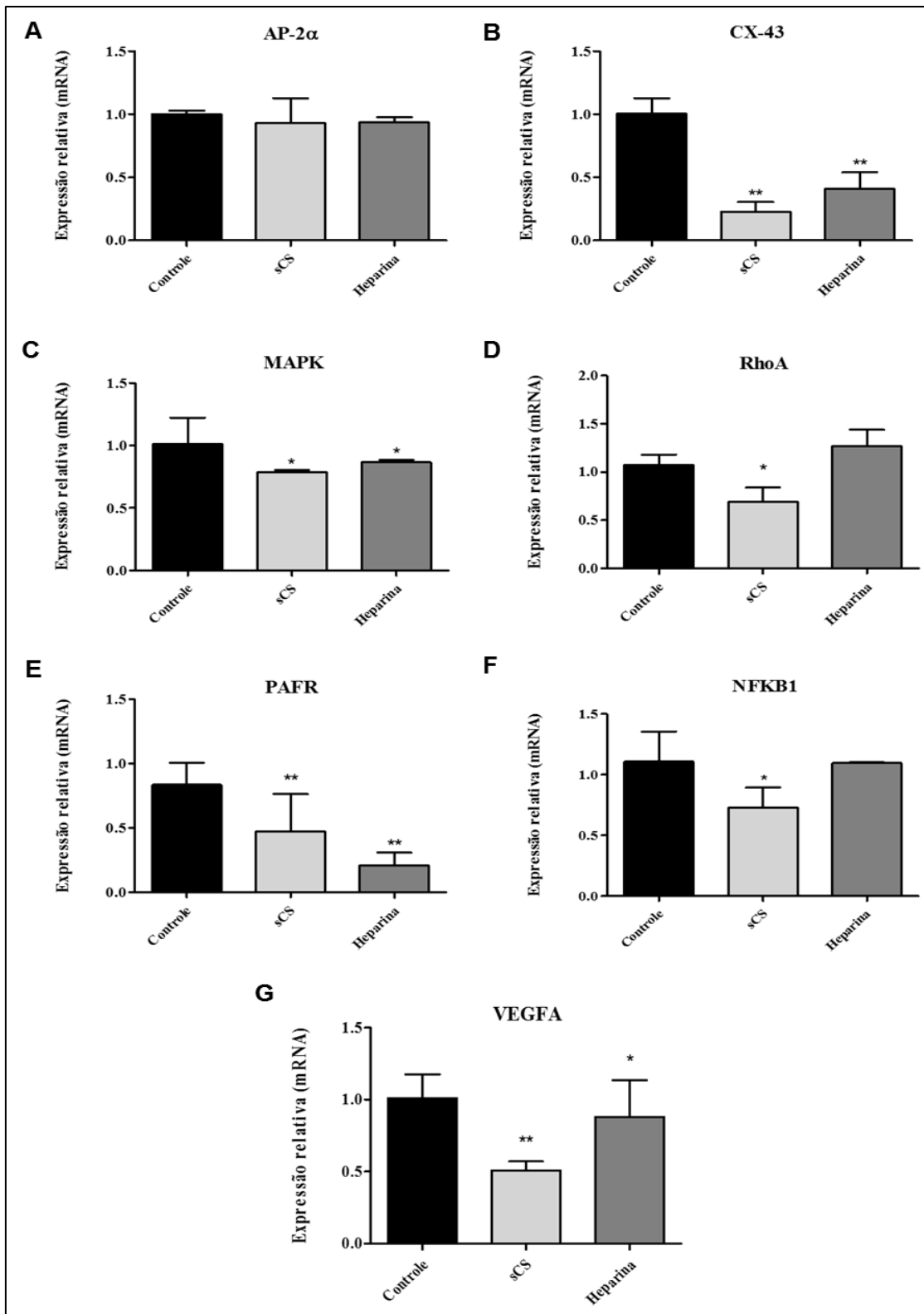


Figura 16. Efeito do sCS e heparina na expressão de genes relacionados ao melanoma em células de melanoma B16F10. As células foram tratadas com 100 µg/mL de GAGs. Após 24 horas os níveis de expressão dos genes PAR-1, RhoA, VEGFA, Nfkb1, PAFR, MAPK, Maspin, AP-2α e CX-43 foram examinados por qPCR em tempo real. Os genes endógenos GAPDH e β-ACTINA foram utilizados como controle interno em tempo real qPCR. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.3.6 Efeito do sCS na produção de melanina pelas células de melanoma B16F10

Estudos demonstraram que a melanogênese pode influenciar o comportamento de melanócitos normais e malignos, além do microambiente circundante devido à ação de intermediários da melanogênese sobre o consumo de oxigênio, estimulação da glicólise aeróbia ou interação com outras vias metabólicas, favorecendo uma resistência do tumor à quimio, radio e fototerapias (SLOMINSKI, PAUS & MIHM, 1998; SLOMINSKI et. al., 2004; SLOMINSKI, ZBYTEK & SLOMINSKI, 2009; SLOMINSKI, ZMIJEWSKI & PAWELEK, 2012; SLOMINSKI et. al. 2014). Portanto, como a melanogênese tem o potencial de regular o comportamento do tumor, foi avaliado o efeito do sCS na produção de melanina das células de melanoma B16F10. Como mostrado na Fig. 17, o tratamento com o sCS diminuiu significativamente ($p < 0,001$) a produção de melanina de forma dependente de concentração, quando comparado com as células sem tratamento. À 100 $\mu\text{g/mL}$, ambos sCS e a heparina atingiram 52% e 57% de inibição da produção de melanina, respectivamente. Esses dados sugerem uma modulação importante das características da células de melanoma.

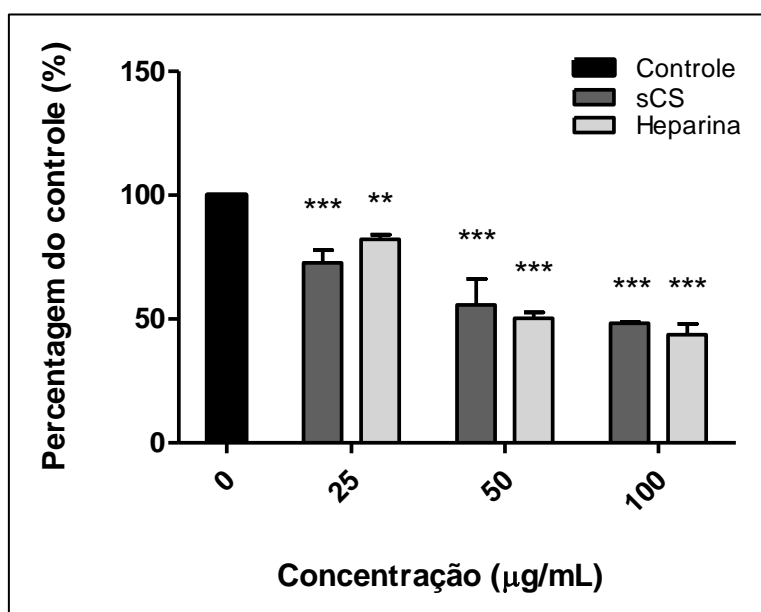


Figura 17. Efeito do sCS e heparina sobre a produção de melanina pelas células de melanoma B16F10. As células foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de sCS ou Heparina. Após 48h as células foram lisadas e foi quantificado o conteúdo de melanina. Os valores observados indicam as porcentagens em relação ao controle (grupo sem tratamento). *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ indicam diferença estatística em relação ao controle.

4.3.7 Efeito do sCS na produção de TNF- α pelas células de melanoma B16F10

Sabe-se que fatores parácrinos tumorais, como as citocinas pró-inflamatórias, podem contribuir para o aumento da eficiência da migração trans-endotelial das células tumorais através da modulação da permeabilidade endotelial (CHEN, WHISLER & JEON, 2013). Dentre tais citocinas, níveis elevados de TNF- α mostraram-se associados à agressividade dos tumores de melanoma (ROSSI et. al 2018) e por isso, a quantidade desta citocina liberada por células de melanoma foi mensurada através do método de ELISA. Na Figura 18 podemos verificar que na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, o sCS foi capaz de inibir cerca de 75% dos níveis de produção de TNF- α pelas células de melanoma, quando comparado ao controle positivo. Resultados semelhantes foram encontrados para a heparina na mesma concentração onde seu percentual de inibição foi de 76,4%. Anteriormente, esse composto foi capaz de diminuir os níveis de citocinas, incluindo o TNF- α , em um modelo de inflamação aguda *in vivo* (PALHARES et. al. 2019).

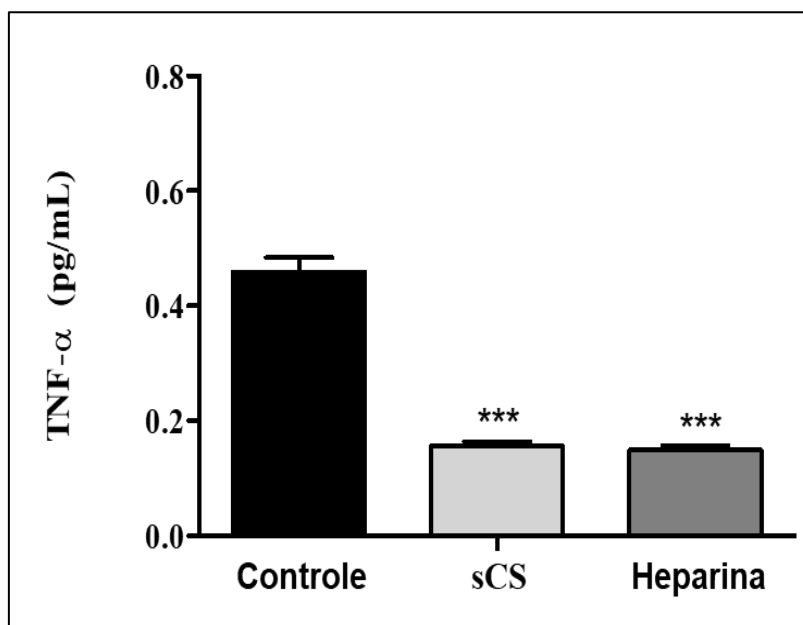


Figura 18. Efeito do sCS e heparina na produção de níveis de TNF- α secretados pelas células B16F10. As células foram incubadas na ausência (controle) ou na presença de sCS ou Heparina. Após 48h as células foram lisadas e o conteúdo de TNF- α foi quantificado através do método de ELISA. Valores são a média \pm desvio padrão dos três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA (two-way) e pós-teste de Bonferroni (***) $p < 0,001$). As barras indicam o erro padrão das medições.

4.4 Avaliação do efeito anti-melanoma *in vivo* do sCS

4.4.1 Efeito do sCS sobre o crescimento tumoral *in vivo*

Para determinar o efeito do sCS sobre o crescimento tumoral *in vivo* foi induzida a formação de um tumor sólido pela inoculação de células de melanoma B16F10 no flanco de camundongos C57BL/6. Após 25 dias, com o tratamento (doses de 300 µg/Kg/animal) sendo realizado 03 vezes por semana, os animais foram submetidos à cirurgia para excisão de seus tumores e pulmões. Como observado na figura 19, os animais tratados apenas com PBS estéril (controle positivo) desenvolveram uma massa tumoral com peso médio de $3,85 \pm 0,26$ g, com uma taxa de mortalidade de 20%. Esse percentual de mortalidade era previsto, uma vez que a alta agressividade do tumor de melanoma está diretamente relacionada com uma alta taxa de mortalidade, especialmente em indivíduos sem tratamento (GLOBOCAN, 2018). Dentre o grupo de animais tratados com sCS, 30% dos animais chegaram a não apresentar crescimento tumoral visível, enquanto que os tumores que se desenvolveram exibiram peso médio de $0,4 \pm 0,17$ g. Dos camundongos submetidos ao tratamento com heparina, 10% não desenvolveram o tumor e a massa tumoral excisada dos demais apresentou peso médio de $1,32 \pm 0,35$. Os percentuais de inibição do crescimento tumoral para sCS e heparina foram de 89,5% e 71,1%, respectivamente, quando comparado ao grupo de animais com desenvolvimento tumoral não tratados (controle). Já a porcentagem de mortalidade apresentada no grupo de animais tratados com heparina foi de 20%, enquanto que para o grupo do sCS não foram observadas mortes durante o período do experimento (Figura 19B).

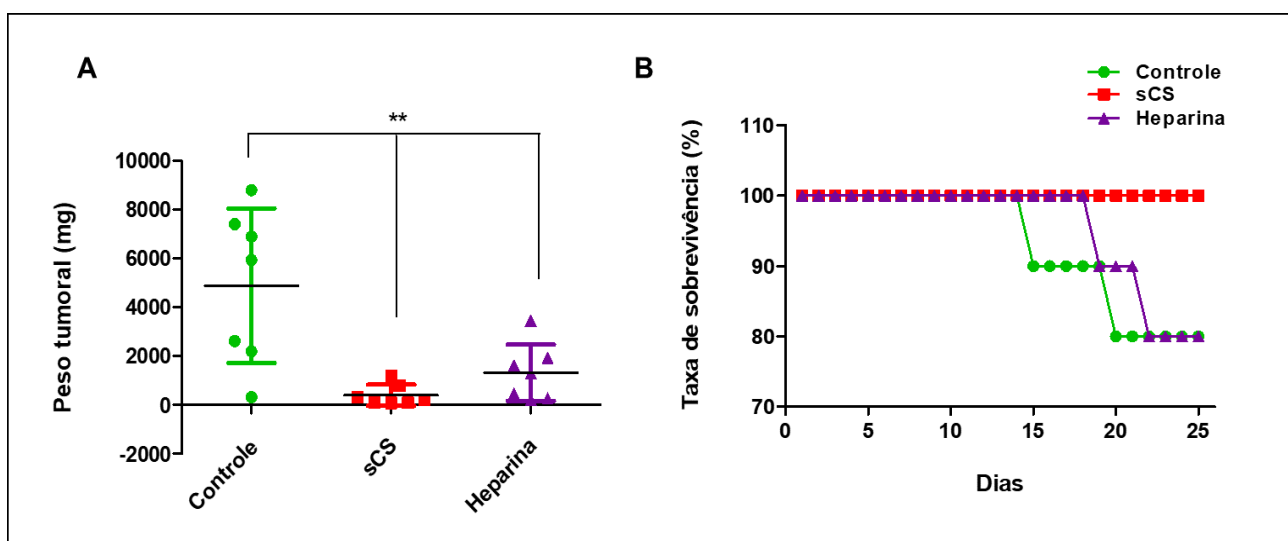


Figura 19. (A) Inibição do crescimento tumoral *in vivo* pelo sCS e heparina. Camundongos C57bl/6 foram inoculados com células de melanoma B16F10 e o crescimento tumoral foi observado por 25 dias na ausência (controle positivo) ou presença de tratamento (300µg/Kg/animal de sCS ou Heparina). A análise estatística foi realizada comparando os grupos de tratamento com o grupo controle, onde os animais que receberam a inoculação de células foram tratados com placebo (PBS). A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA (two-way) e pós-teste de Bonferroni (** $p < 0,01$). As barras indicam o erro padrão das medições. **(B)** Cada animal submetido ao experimento foi monitorado quanto aos sinais vitais e a taxa de mortalidade foi verificada para cada grupo. Após o fim do experimento os números de mortes foram contabilizados e comparados com o grupo controle negativo, onde animais saudáveis não receberam inoculação de células e receberam apenas tratamento placebo (PBS).

4.4.2 Efeito do sCS na expressão de genes relacionados ao melanoma *in vivo*

Todos os resultados exibidos pelo sCS, incluindo a análise da expressão de genes associados à progressão do melanoma, *in vitro*, sugerem que este composto é capaz de modular o desenvolvimento tumoral de forma intrínseca. Portanto, foi despertado o interesse de avaliar o efeito do sCS sobre os níveis de expressão destes genes em um modelo *in vivo* de desenvolvimento tumoral por um longo período de tempo (25 dias). Para tanto, secções de tumores e pulmões excisados dos animais submetidos ao ensaio de tumorigênese, induzidos com células de melanoma B16F10, foram submetidos à extração de RNA e posterior quantificação de mRNA por RT-qPCR, como exibido na figura 20. As análises das secções de tumores, mostraram que nos animais tratados com sCS e heparina houve uma diferença significativa da expressão de praticamente todos os genes ($p < 0,05$; 001; e 0,001), quando comparado ao

animais do grupo controle (sem tratamento), exibindo um perfil de modulação gênica distinto daquele apresentado na análise *in vitro*. No modelo *in vivo*, a expressão do gene PAR-1 o qual é principalmente ativado pela trombina, foi não somente detectada, bem como o sCS foi capaz de diminuir seus níveis em 89% ($p < 0,001$), enquanto que a heparina diminuiu em 64% ($p < 0,05$) (Fig.20A). Já para o gene AP-2 α foi observado aumento dos níveis de mRNA nos tumores de animais dos grupos tratados com sCS ($p < 0,05$) e heparina ($p < 0,01$), o que corrobora com a diminuição da expressão de PAR-1 e Cx-43. AP-2 α é um fator transcripcional responsável pela regulação translacional do PAR-1, funcionando assim de forma antagônica à expressão de PAR-1. Além disso, o sCS demonstrou efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) sobre os níveis de mRNA de Cx-43, que por sua vez é diretamente relacionada ao aumento de PAR-1 em células de melanoma metastático (ARUMUGAM et. al., 2008).

O efeito *in vivo* de PAR-1 no melanoma é ainda exibido pela regulação da quinase MAPK (VILLARES et. al., 2011). Interessantemente, a expressão de MAPK foi significativa apenas nos tumores de animais tratados com sCS ($p < 0,05$). Adicionalmente, a angiogênese é um importante marco do desenvolvimento tumoral e tem como principal responsável, o VEGFA. Assim, apresentando um efeito modulador sobre as vias de sinalização no melanoma, ambos sCS e heparina, reduziram em 75% ($p < 0,01$) e 41% ($p < 0,05$), respectivamente, os níveis de expressão de VEGFA quando comparado ao grupo controle. Por fim, o sCS exibiu inibição dos níveis de mRNA dos genes RhoA, PAFR ($p < 0,05$) e NF κ B1 ($p < 0,01$), em 77%, 85% e 39% respectivamente em relação ao grupo controle, enquanto que a heparina mostrou efeito apenas sobre a diminuição da expressão de RhoA ($p < 0,05$) e NF κ B1 ($p < 0,01$).

O alto potencial metastático do melanoma, coloca este tipo de câncer como um dos mais agressivos, com tendência à reincidir para múltiplos órgãos, com especial tropismo das células de melanoma para o pulmão, fígado e cérebro (BALCH et. al., 2009; MASSAGUÉ & OBENAUF, 2016). O mesmo conjunto de genes foi avaliado quanto à sua expressão em lóbulos dos pulmões dos animais submetido ao ensaio de tumorigênese. Semelhante aos

resultados obtidos para os tumores, os níveis de expressão do gene PAR-1 no pulmão foram consideravelmente menores nos grupos de tratamento com sCS e heparina, exibindo 71% ($p < 0,01$) e 69% ($P < 0,01$) de inibição quando comparado ao grupo controle, respectivamente (Fig. 21). De forma interessante, quando comparado ao grupo controle, a análise de RT-qPCR para o AP-2 α exibiu um aumento na sua expressão de mais de 3 vezes (aumento de 336%) no grupo sCS e 2.6 vezes no grupo de tratamento com a heparina. Porém, para o terceiro gene da tríade de modulação do PAR-1, o CX-43, ambos sCS e heparina não demonstraram efeito significativo na redução da sua expressão.

sCS foi capaz ainda de exibir níveis diminuídos em torno de 72% de mRNA para MAPK e 58% de VEGFA1 ($p < 0,05$), enquanto que heparina modulou significativamente apenas a expressão de VEGFA ($P < 0,05$). A análise dos pulmões mostrou ainda que para os animais tratados com sCS os níveis de mRNA dos genes PAFR e NFKB1 foram menores em 87% e 79%, respectivamente, enquanto que para RhoA apenas a heparina apresentou efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) sobre sua expressão.

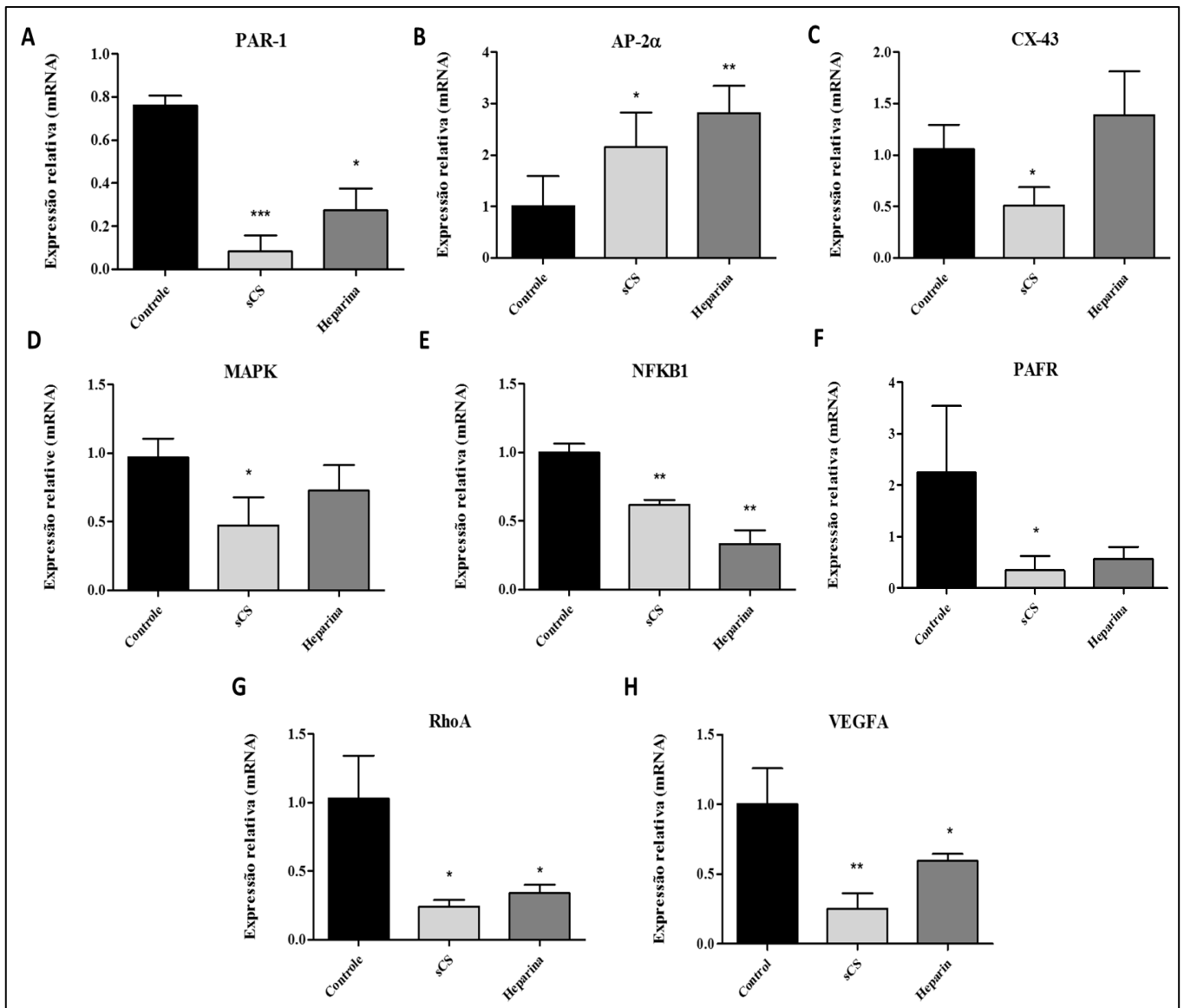


Figura 20. Efeito do sCS e heparina na expressão de genes relacionados ao melanoma em tumores murinos de melanoma. Os animais foram tratados com 300 µg/Kg/animal de sCS, heparina ou PBS (controle) 03 vezes por semana, durante um período de 25 dias. A expressão dos genes PAR-1, RhoA, VEGFA, NFKb1, PAFR, MAPK, AP-2α e CX-43 foi quantificada por PCR em tempo real. Os genes endógenos GAPDH e β-ACTIN foram utilizados como controle interno em tempo real PCR. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A significância estatística foi determinada pelo *t*-test (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$). As barras indicam o desvio padrão das medições.

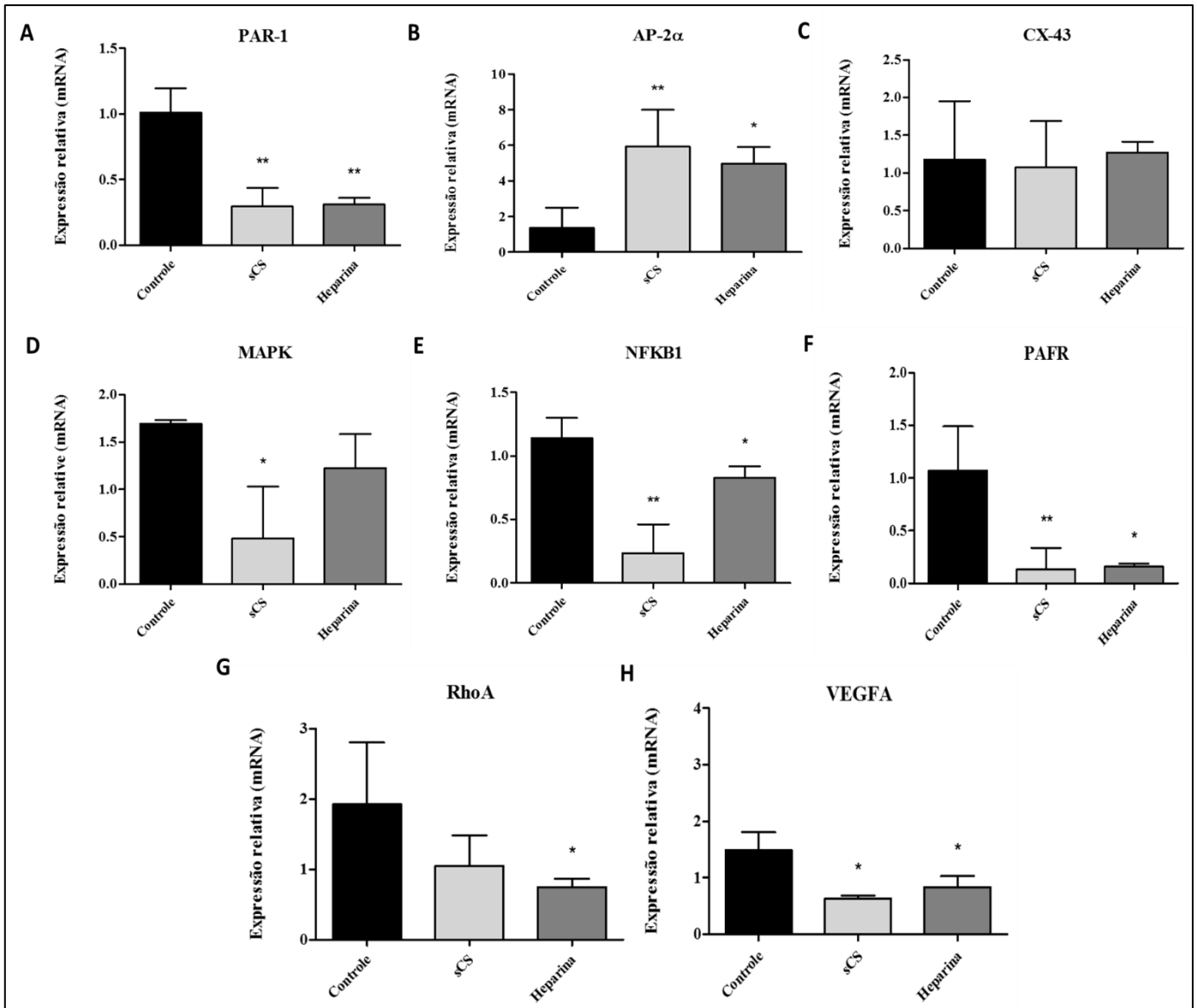


Figura 21. Efeito do sCS e heparina na expressão de genes relacionados ao melanoma em seções de pulmões de camundongos C57bl/6 com melanoma induzido por células B16F10. Os animais foram tratados com 300 µg/Kg/animal de sCS, heparina ou PBS (controle) 03 vezes por semana, durante um período de 25 dias. A expressão dos genes PAR-1, RhoA, VEGFA, Nfkb1, PAFR, MAPK AP-2α e CX-43 foi quantificada por PCR em tempo real. Os genes endógenos GAPDH e β-ACTIN foram utilizados como controle interno em tempo real PCR. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. A significância estatística foi determinada pelo *t*-test (***p* < 0,001; ** *p* < 0,01 e * *p* < 0,05). As barras indicam o desvio padrão das medições.

4.4.3 Efeito do sCS sobre a secreção de citocinas e VEGF durante o crescimento tumoral *in vivo*

À medida que o tumor se desenvolve, um microambiente ao redor do tumor é formado através da intensa secreção de fatores de crescimento e pró-angiogênicos, além de citocinas, com o objetivo de permitir o sucesso do progresso tumoral. Por essa razão, o sangue dos animais submetidos ao ensaio de crescimento tumoral foi quantificado para os níveis da interleucina 1- β (IL-1 β), do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o fator pró-angiogênico VEGF pelo método de ELISA. Durante o desenvolvimento tumoral, ambos os compostos foram capazes de modular a secreção das citocinas testadas de forma significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) (Figura 22). Quando comparado ao grupo controle positivo, foi observada uma diminuição nos níveis de IL-1 β em cerca de 32% e 52% para os animais tratados com sCS e heparina, respectivamente. Para os níveis mensurados de TNF- α , a inibição chegou a 65% e 63% para o sCS e heparina, respectivamente, comparado com o controle positivo.

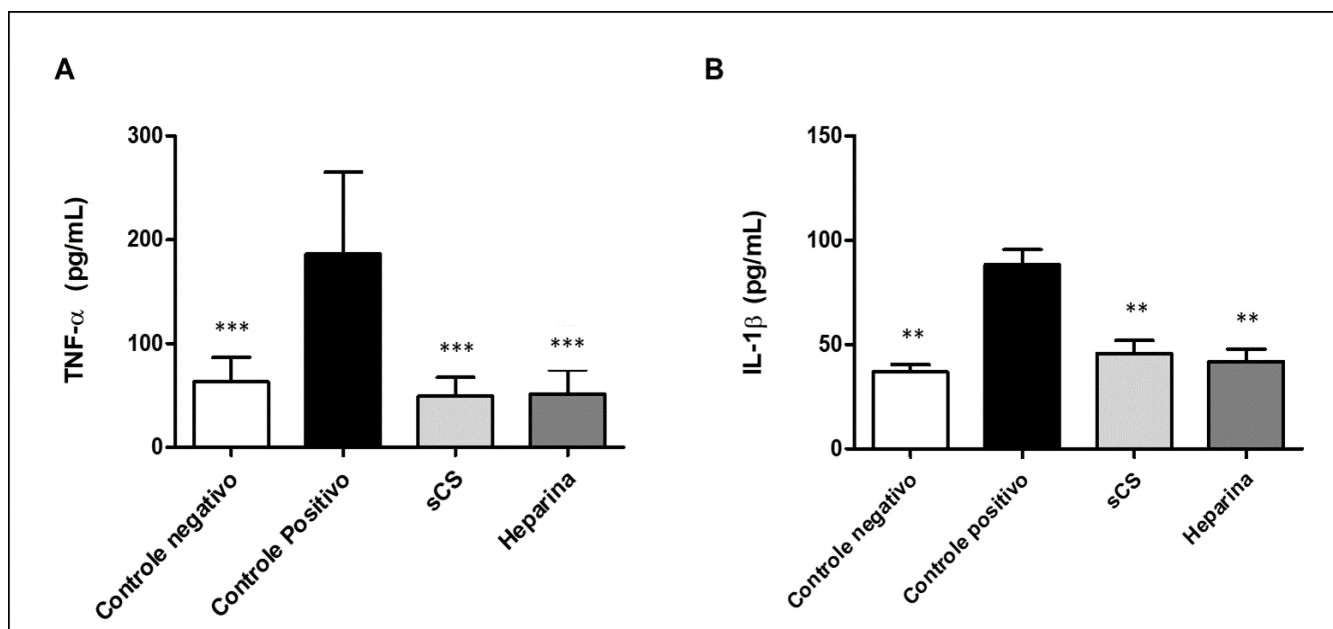


Figura 22. Efeitos do sCS e heparina na produção de níveis de (A) TNF- α e (B) IL-1 β no plasma dos animais submetidos ao ensaio de crescimento tumoral. Os animais foram tratados com 300 $\mu\text{g/Kg/animal}$ de sCS, heparina ou PBS (controle) 03 vezes por semana, durante um período de 25 dias. Os níveis das citocinas presentes no plasma dos animais foram mensurados através do método imuno-enzimático de ELISA. Valores são a média \pm desvio padrão dos três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA (two-way) e pós-teste de Bonferroni (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). As barras indicam o desvio padrão das medições.

Durante a progressão do tumor de melanoma, o sCS foi ainda capaz de inibir em torno de 88% ($p < 0,001$) a secreção de VEGF no sangue dos animais, quando comparado com o controle positivo. O grupo que recebeu tratamento com heparina diminuiu em 80% a secreção do fator pró-angiogênico (Fig. 23).

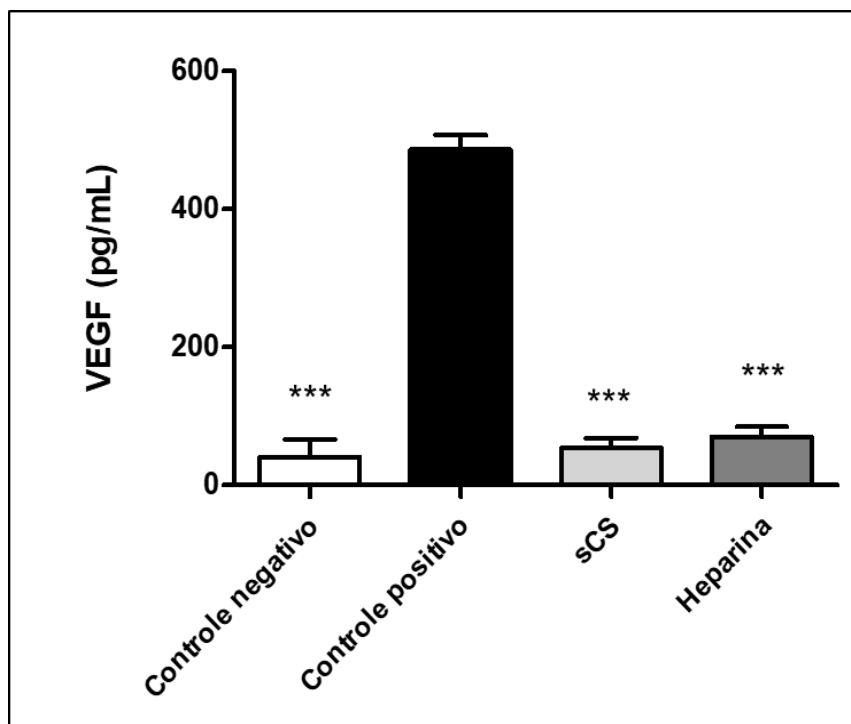


Figura 23. Efeito do sCS e heparina na produção de níveis de VEGF no plasma dos animais submetidos ao ensaio de crescimento tumoral. Os animais foram tratados com 300 $\mu\text{g/Kg/animal}$ de sCS, heparina ou PBS (controle) 03 vezes por semana, durante um período de 25 dias. Os níveis de VEGF presentes no plasma dos animais foram mensurados através do método imuno-enzimático de ELISA. Valores são a média \pm desvio padrão dos três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA (two-way) e pós-teste de Bonferroni (***) $p < 0,001$). As barras indicam o erro padrão das medições.

4.4.4 Efeito do sCS sobre a histologia e expressão tecidual de PAR-1 e VEGF durante o crescimento tumoral *in vivo*

Uma vez que as células do melanoma deixam o epitélio epidérmico e invadem o tecido mesenquimal subjacente, como a derme ou a submucosa, o melanoma torna-se invasivo. De acordo com Banco de dados de teste de melanoma, desenvolvido pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, os fatores mais predominantes de prognóstico em pacientes com melanoma local são: espessura do tumor, taxa de crescimento mitótico (histologicamente definido como número de mitoses/ mm^2) e ulceração (BALCH et. al., 2009).

Assim, afim de avaliar o padrão histológico dos tumores, bem como identificar focos metastáticos no pulmão dos animais submetidos ao ensaio de tumorigênese, cortes dos tumores sólidos e dos lóbulos pulmonares excisados dos animais foram obtidos para análise histológicas.

As amostras histológicas dos tumores de todos os grupos, apresentaram melanócitos, células de melanoma com núcleos mitóticos, presença de infiltrado inflamatório, necrose e neovascularização (Fig.24A-C). Algumas destas características podem ainda ser observadas em nível macroscópico na morfologia da massa tumoral excisada em alguns animais, como a presença de necrose e vascularização ao redor do tumor (Fig.24D-F). Para os cortes do grupo controle foram observados ainda presença de adipócitos, necrose e alto número de células com núcleos mitóticos sugerindo intensa proliferação celular, quando comparado com os grupos de tratamento (Fig.24A). A histologia dos tumores de animais tratados tanto com sCS quanto com heparina mostrou ainda presença de células tumorais com citoplasma eosinofílico e núcleo disperso ou degenerado, com consequente presença de células apoptóticas (Fig.24B-C).

A análise dos cortes de pulmão, evidenciou que em todos os grupos de animais, com exceção para o grupo sem indução tumoral (controle negativo), foram identificados infiltrado inflamatório e presença de melanócitos nas adjacências dos alvéolos pulmonares, sugerindo presença de metástase pulmonar (Fig. 25) pelas células de melanoma.

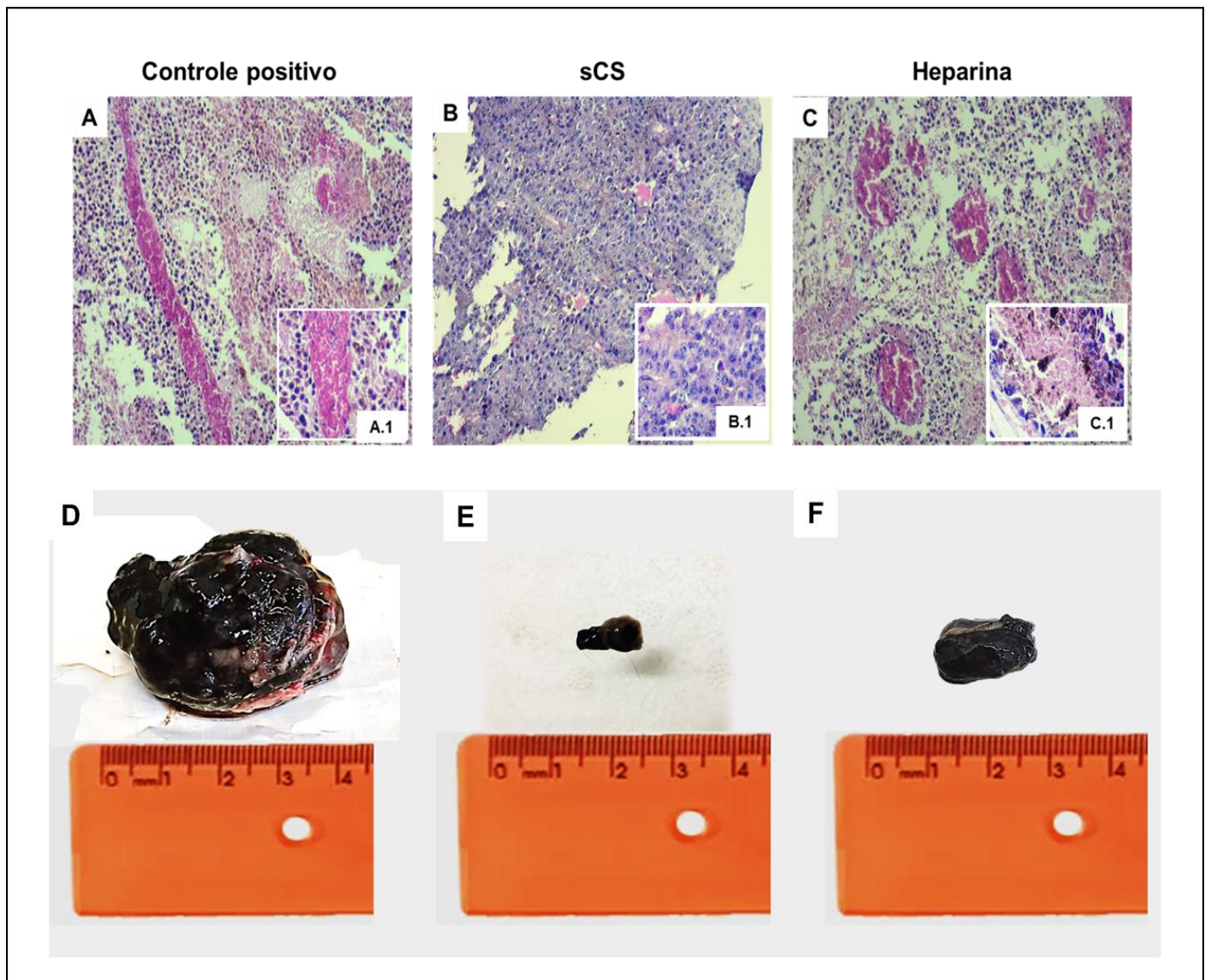


Figura 24. (A-C) Fotomicrografias representativas da análise histológica de fragmentos de tumores de camundongos C57bl/6 induzidos com células de melanoma B16F10, após 25 dias de experimento. Os animais foram submetidos ao tratamento placebo com (A) PBS (controle positivo), (B) sCS ou (C) heparina nas doses de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{animal}$, 03 vezes por semana. Em seguida, os tumores dos animais foram excisados e submetidos à análise histológica Scale Bar 400x (A - D) e 1000x (B.1 - D.1). (D-F) Imagens representativas de tumores excisados de cada grupo de tratamento.

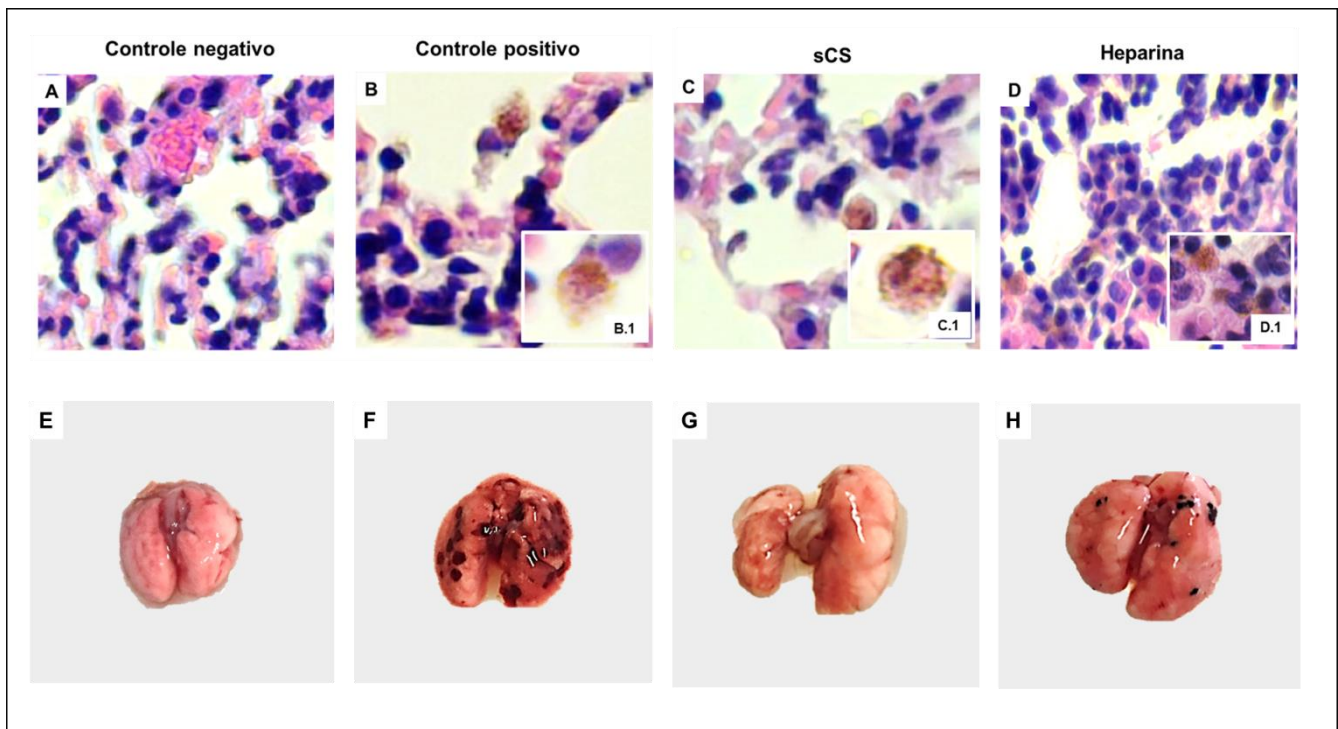


Figura 25. (A-D) Fotomicrografias representativas da análise histológica de fragmentos de pulmões de camundongos C57bl/6 (A, E) sem indução tumoral (controle negativo) e (B-C, F-H) induzidos com células de melanoma B16F10, após 25 dias de experimento. Os animais foram submetidos ao tratamento placebo com (B) PBS (controle positivo), (C) sCS ou (D) heparina nas doses de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{animal}$, 03 vezes por semana. Em seguida, os pulmões dos animais foram excisados e submetidos à análise histológica. Scale Bar 400x (A - D) e 1000x (B.1 - D.1). (E-H) Imagens representativas de pulmões excisados de cada grupo de tratamento.

As secções de tumores e pulmões dos animais submetidos ao experimento de tumorigênese foram ainda analisadas quanto à expressão do receptor de trombina PAR-1 e o do fator pró-angiogênico VEGF por imunohistoquímica. A figura 26A mostra a marcação positiva para ambas proteínas, em amostras de tumores de todos os grupos analisados. Contudo, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) apenas para os níveis de PAR-1 (Fig.26B). Os tumores de animais tratados com sCS ou heparina apresentaram níveis diminuídos para marcação de PAR-1 em torno de 40%, quando comparado com os tumores de animais do grupo controle positivo.

Para os cortes de pulmão, a imuno-histoquímica evidenciou que o tratamento com sCS e heparina induziu uma diminuição em cerca de 60% e 56% ($p < 0,001$), respectivamente, nos níveis de PAR-1 marcados no tecido pulmonar durante o desenvolvimento tumoral, quando comparado com controle positivo

(Fig.27). Como esperado, não foi observada marcação positiva de PAR-1 nos pulmões dos animais do controle negativo (Fig.27A). As amostras dos grupos de animais tratados com sCS exibiu ainda uma diminuição de aproximadamente 34% ($p < 0,05$) dos níveis de marcação para VEGF nos tecidos pulmonares, quando comparado com o controle positivo. Já o grupo de tratamento com heparina exibiu taxas de inibição em torno de 42% ($p < 0,05$), atingindo os mesmos níveis encontrado para o controle negativo, grupo de animais saudáveis sem a presença de tumor (Fig. 27C).

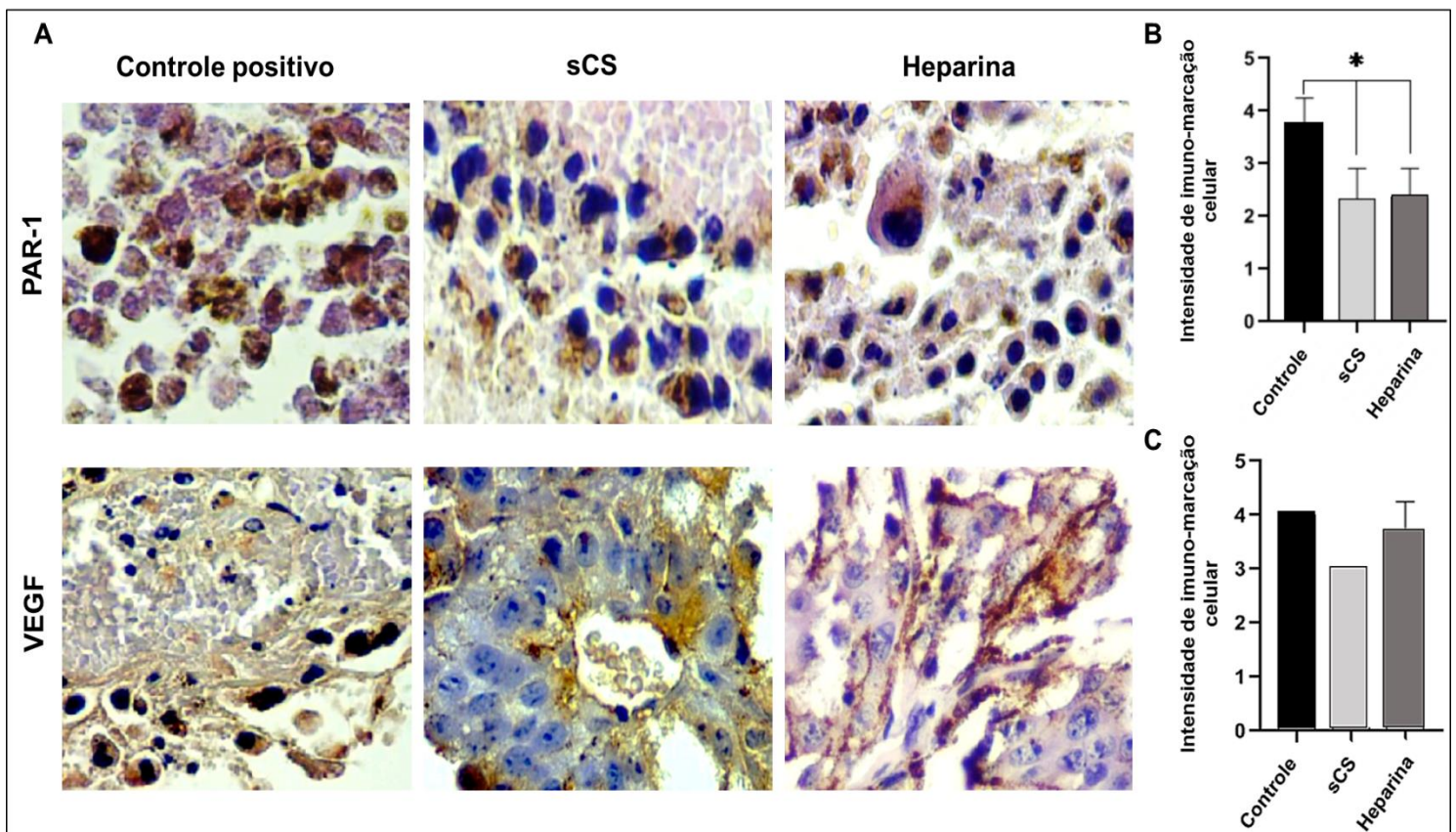


Figura 26. (A) Fotomicrografias representativas da análise imuno-histoquímica para PAR-1 e VEGF de fragmentos de tumores de camundongos C57bl/6 induzidos com células de melanoma B16F10, após 25 dias de experimento. Os animais foram submetidos ao tratamento placebo com PBS (controle positivo), sCS ou heparina nas doses de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{animal}$, 03 vezes por semana. Em seguida, os tumores dos animais foram excisados e submetidos à análise imuno-histológica. (B-C) Análise de imuno-marcação positiva para PAR-1 e VEGF. Scale Bar 400x.

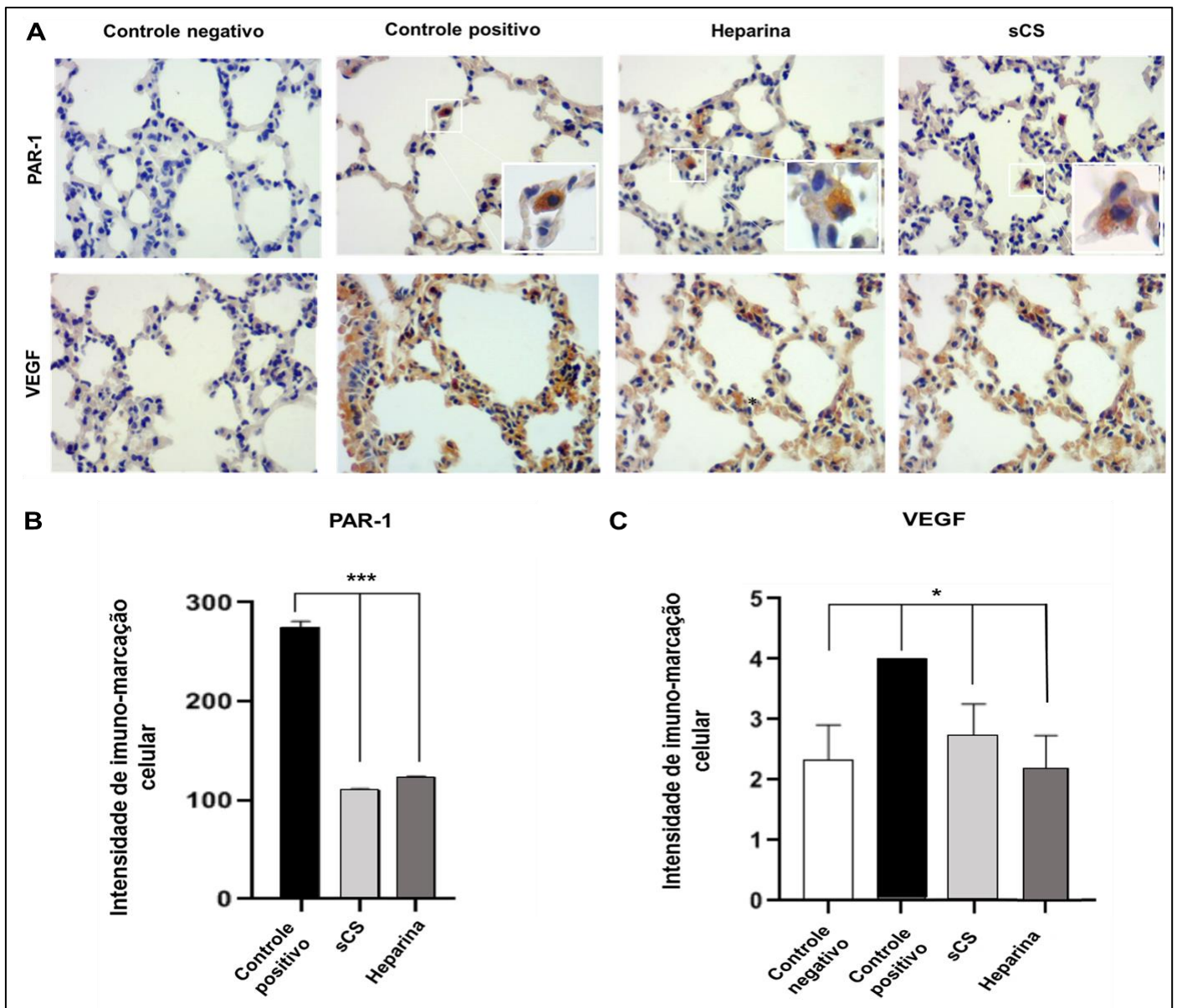


Figura 27. (A) Fotomicrografias representativas da análise imuno-histoquímica para PAR-1 e VEGF de fragmentos de pulmões de camundongos C57bl/6 (A) sem indução tumoral (controle negativo) e induzidos com células de melanoma B16F10, após 25 dias de experimento. Os animais foram submetidos ao tratamento placebo com PBS (controle positivo), sCS ou heparina nas doses de 300 µg/Kg/animal, 03 vezes por semana. Em seguida, os pulmões dos animais foram excisados e submetidos à análise imuno-histológica (B-C) Análise de imuno-marcação positiva para PAR-1 e VEGF. Scale Bar 400x.



DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

No intuito de promover o crescimento, sobrevivência e uma consequente metástase tumoral, as células malignas promovem a construção de um nicho próprio, o qual consiste em um microambiente favorável pra a progressão tumoral. Durante o desenvolvimento tumoral, o tumor é capaz de induzir a produção de uma variedade de moléculas biologicamente importantes tais como proteases, interleucinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e fatores angiogênicos, levando à ativação de processos fisiológicos importantes como a inflamação e coagulação (TAYLOR et al, 2006, ANGIOLILLO, 2010; QUAIL & JOYCE, 2013). Dentre essas moléculas, a trombina, principal protease da coagulação, tem um importante papel no desenvolvimento do câncer. Através do receptor de protease PAR-1 a trombina desencadeia uma sinalização capaz de promover eventos imprescindíveis para o sucesso tumoral, como proliferação, migração, agregação plaquetária e angiogênese (HU et.al., 2004; 2008; NIEMAN et. al., 2010; MENTER et. al., 2014; WOJTUKIEWICZ et. al., 2015). Deste modo, essas evidências reforçam a ideia de que a sinalização através das proteases de coagulação, como a trombina, têm uma contribuição importante no câncer (COUGHLIN, 2000; HU et. al., 2008 WOJTUKIEWICZ et. al., 2015; 2016), e por isso, a identificação de novos alvos terapêuticos que possam atuar na modulação simultânea desses eventos podem apresentar mais êxito do que uma terapia alvo-específica.

Dentro desse contexto, nos últimos anos nosso grupo de pesquisa purificou e caracterizou polissacarídeos do tipo glicosaminoglicanos a partir do cefalotórax do camarão *Litopenaeus vannamei* (BRITO et. al., 2008; 2014, CHAVANTE et. al., 2014; CAVALCANTE et. al., 2018; PALHARES et. al., 2019). Alguns desses polissacarídeos são conhecidos por sua capacidade de inibir proteases da coagulação como a trombina (BRITO et. al., 2014; CAVALCANTE et. al., 2018; PALHARES et. al., 2019). No presente trabalho, foi caracterizado um GAG do tipo condroitim sulfato também obtido do camarão *Litopenaeus vannamei* (sCS), o qual apresentou em um trabalho anterior, uma potente capacidade de inibir a trombina, bem como um efeito anti-inflamatório

in vivo, através da inibição da migração leucocitária e produção de citocinas pró-inflamatórias (PALHARES et. al., 2019).

No intuito de caracterizar a composição dissacarídica do CS de camarão, o mesmo foi submetido à análise de seus dissacarídeos predominantes em cromatografia de alta performance (HPLC), o qual apresentou como principais produtos dissacarídeos 25.9 % de Δ U-GalNAc não-sulfatado e 74.1 % de dissacarídeos com sulfatação nas posições 4 ou 6 e ambos 4,6 (Δ U-GalNAc-4-O-sulfato; Δ U-GalNAc-6-O-sulfato e Δ U-GalNAc-4,6 di-O-sulfato, respectivamente). Embora a presença de proporções significativas do dissacarídeo Δ U-GalNAc-4,6 di-O-sulfato possa sugerir um estrutura do tipo CS-E, outras estruturas também foram evidentes e justificaram a investigação adicional por espectroscopia de RMN. Como descrito anteriormente (SUGAHARA et al., 1996), as cadeias de CS contendo GlcA 3-O-sulfatada são resistentes à ação da condroitinase AC-II, enquanto a digestão com condroitinase ABC desses oligossacarídeos resulta no aparente desaparecimento do resíduo de dissacarídeo 3-O-GlcA. Desta forma, é possível que após o tratamento do CS do camarão com as condroitinases ACII e ABC, porções significativas da molécula não puderam ser digeridas e assim, não foram detectadas pela absorbância à 232nm no HPLC. Em contraste, a análise de RMN permitiu que todas as variantes estruturais fossem detectadas. A caracterização estrutural foi realizada utilizando uma combinação de espectroscopia unidimensional (^1H e ^{13}C), bidimensional, homonuclear (COSY, TOCSY e NOESY) e heteronuclear bidimensional (HSQC e HMBC).

A análise do sCS obtido do camarão por RMN revelou a ocorrência de oito variantes de monossacarídeos constituintes denominadas aqui: GlcA, GlcA-3Si, GlcA-3Sii, GalNAc4Si, GalNAc-4Sii, GalNAc-6Si, Gal-NAc-6Sii and GalNAc-4,6S. As ligações evidentes do tipo GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc em ambos $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC foram mostradas. Os espectros revelam quatro variantes de dissacarídeos dissulfatados e um tri-sulfatados: GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-4,6S, GlcA-3Si $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-4Si, GlcA-3Si $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-4Sii, GlcA-3Si $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-4,6S and GlcA-3Sii $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc-6Si. Os cinco dissacarídeos identificáveis por RMN parecem consistentes com os resultados

de HPLC derivados da amostra tratada com condroitinase. Ligações inter-dissacarídicas GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$ GlcA, foram também observadas por espectro $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC entre GalNAc-4Si and GlcA, GalNAc-4Sii e GlcA-3Si, GalNAc-4,6S e GlcA-3Sii, GalNAc-6Si e GlcA e GalNAc-6Sii e GlcA. Não foram identificados sinais correspondentes aos dissacarídeos contendo GlcA-2,3S, distinguindo essas cadeias das anteriormente isoladas de outra subfração de sCS (CAVALCANTE et. al., 2018), revelando uma estrutura peculiar para essa forma de sCS. A ocorrência natural de resíduos GlcA 3-O sulfatados nas cadeias CS é rara e foi relatada em apenas algumas fontes de animais marinhos (KITAGAWA, 1997; MOU et al., 2018; SHETTY et al., 2009; SUGAHARA et. al., 1996), sugerindo que esse padrão pode exigir uma maquinaria enzimática específica.

Grupos 3-O-sulfato em posição terminal nos resíduos de GlcA da trombomodulina de amostras de urina humana podem ser reconhecidos por um anticorpo monoclonal HNK-1 (human natural killer-1) (NADANAKA et al., 1998). Posteriormente, a sulfotransferase de HNK-1 (HNK-1ST) que catalisa a 3-O-sulfatação de GlcA terminal no precursor de antígeno de carboidrato HNK-1 também foi identificada como envolvida na 3-O-sulfatação da região de ligação de GlcA, levando à geração de um epítipo único de HNK-1 (HASHIGUCHI et al., 2011; NAKAGAWA et al., 2011). Os resíduos de GlcA 3-O-sulfatados foram descritos em outras sequências dissacarídicas de glicoproteínas e glicolipídicos em mamíferos (ILYAS, DALAKAS, BRADY, & QUARLES, 1986). Em todos os casos, foi demonstrado que esse padrão único de sulfatação requer a mesma 3-O-sulfotransferase (HASHIGUCHI et al., 2011; NAKAGAWA et al., 2011). No entanto, até o momento, não foi identificada uma 3-O-sulfotransferase responsável pelo padrão 3-O-sulfato em resíduos de GlcA caracterizado para moléculas de CS obtidas de fontes marinhas.

A biossíntese de CS é ditada por múltiplas enzimas, que podem exibir padrões de expressão específicos do tipo de organismo, levando potencialmente à diversidade funcional de CSPGs entre diferentes espécies de animais. Essa diversidade é exibida devido às inúmeras variações estruturais que os GAGs podem apresentar quanto ao comprimento da cadeia

polissacarídica, sequência dissacarídica, além do grau e padrão de sulfatação. GAGs são moléculas com alto grau de eletronegatividade que atuam como verdadeiros “ímãs” nos diversos sistemas biológicos, se ligando e interagindo com uma gama diversa de proteínas fisiológicas. As características estruturais peculiares desses compostos distinguem o processo biossintético do modelo clássico da biossíntese de GAGs, sugerindo uma relação entre o padrão de sulfatação dos GAGs e a evolução animal. Esse padrão de sulfatação por sua vez, foi apontando por muitos anos como sendo uma característica crucial para estes polissacarídeos apresentarem diferentes potenciais biológicos, contudo estudos mais recentes mostram que a sulfatação por si somente não é a única particularidade que define a função biológica de um determinado GAG, devendo-se levar em consideração o conjunto de características da molécula, como tamanho da cadeia, grupos substituintes e até o efeito de cluster e não somente uma única característica individual (CHAVANTE et. al., 2014, LIMA et. al., 2013; YATES et. al., 2016).

O mais conhecido efeito biológico dos GAGs é o potencial anticoagulante o qual é frequentemente apresentado através da inibição de fatores importantes da cascata de coagulação, como a trombina (IIa) e FXa. Compostos com atividade anti-IIa podem influenciar diretamente a biologia tumoral, uma vez que a trombina apresenta um papel efetivo na carcinogênese (NIERODZIK, KARPATKIN, 2006; BORENSZTAJN, PEPPELENBOSCH, SPEK, 2008; TSOPANOGLU, MARAGOUDAKIS, 2009; WANG et al., 2010; NIEMAN et. al., 2010; MENTER et. al., 2014; WOJTUKIEWICZ et. al., 2015), além de contribuir para a redução do quadro de hipercoagulabilidade responsável pela maioria das mortes em pacientes oncológicos. Por essa razão, moléculas com essas propriedades são atrativas para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais. Diante disso, e considerando o potencial anticoagulante, mediado pelas atividades anti-IIa e anti-HCII do sCS descrito anteriormente (PALHARES et. al., 2019), foi investigado seu efeito sobre eventos biológicos essenciais para o crescimento tumoral do melanoma como migração, proliferação celular, e secreção de citocinas e melanina, bem como a análise sobre o crescimento tumoral *in vivo*. Além disso, foi avaliado

também o potencial do sCS sobre a expressão de genes relacionados à progressão do melanoma, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

De acordo com a classificação de Clark, o melanoma inicialmente é caracterizado por um crescimento localizado, denominado "fase de crescimento radial" ou "melanoma fino". Durante essa fase, as células de melanoma tendem a proliferar entre as camadas da epiderme e da derme superficial, com risco significativamente baixo de metástase. Com o tempo, o melanoma assume uma aparência mais nodular à medida que as células de melanoma relativamente maiores e irregulares começam a migrar verticalmente e a invadir a derme ("fase de crescimento vertical") (Clark et. al., 1984). Dessa forma, a proliferação e a migração celular constituem as primeiras etapas na colonização do melanoma, e por isso o efeito do sCS sobre esses eventos foi avaliado.

O tratamento em longo prazo (10 dias) com o sCS reduziu drasticamente a atividade mitogênica das células tumorais *in vitro* e sua capacidade de formar colônias, inclusive na ausência de um substrato para ancoragem, sugerindo um mecanismo de modulação do crescimento do câncer. Resultados semelhantes sobre as células de melanoma foram também observados para um GAG híbrido do tipo Hep/HS obtido da mesma espécie de camarão, o qual reduziu em mais de 80% a formação de colônias tumorais de células de melanoma B16F10 (BRITO et. al., 2018). As mutações que promovem a proliferação exacerbada no câncer normalmente ocorrem nos estágios iniciais da evolução tumoral. No melanoma, a tumorigênese pode ser desencadeada por um rápido acúmulo de mutações sucessivas ou através de um melanócito que já abriga alterações genéticas secundárias ou mesmo terciárias, seguido de uma mutação capaz de engatilhar a proliferação, o que geralmente ocorre através da via MAPK (SHAIN & BASTIAN, 2016).

Os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento do câncer são ainda mediados por diversas moléculas sinalizadoras, as quais uma vez ativadas, desencadeiam respostas intracelulares em prol do crescimento tumoral. Dentre essas, os proteoglicanos de superfície apresentam um papel

chave na biologia do câncer. Em células de melanoma a expressão de PGHS é aumentada, ativando os processos de proliferação, adesão e migração celular. A heparina exógena por sua vez, consegue competir com essas cadeias de HS dos PGHSs, impedindo assim a interação destes com fatores de crescimento alvo, o que culmina na inibição de suas repostas celulares, dentre elas a proliferação (NIKITOVIC et al., 2014). Uma vez que foi demonstrado que o sCS não foi capaz de induzir efeito citotóxico ou promover apoptose ou qualquer alteração no ciclo das células de melanoma murino, podemos sugerir que as atividades antitumorais descritas pelo sCS aqui sejam mediadas por outro mecanismo de ação, como por exemplo através da competição com PGs presentes nas células de melanoma.

Além da proliferação, uma característica importante de agressividade do tumor é a invasão aos tecidos vizinhos e formação de metástase. Após a transformação de uma célula normal em uma célula maligna, esta prolifera e migra rapidamente, atingindo tecidos vizinhos e chegando até a circulação sanguínea e o sistema linfático, através dos quais coloniza tecidos mais distantes, criando assim, focos tumorais secundários (MASSAGUÉ & IBENAUF, 2016). Nesse contexto, utilizando células de melanoma B16F10, foi demonstrado que o sCS reduz em cerca de 70% a migração dessas células através de uma membrana permeável e ainda inibe 66% através do ensaio de reparo da fenda. O mecanismo pelo qual GAGs e outros polissacarídeos regulam a proliferação e migração de células tumorais ainda não é totalmente claro.

Sabe-se que a migração das células de melanoma depende da ativação de diferentes proteínas-quinase como a quinase de adesão focal (FAK), uma tirosino-quinase cuja expressão é regulada por p53 (HESS et al., 2005), além das quinases pertencentes à família Rho-quinase, como ROCK1 e ROCK2 (RATH & OLSON, 2012; SADOK et. al., 2015). Estudos mostram que a heparina é capaz de ser internalizada por células tumorais e estimula a expressão e acúmulo de p53 nuclear, promovendo a redução da expressão de FAK e conseqüentemente regulando a motilidade celular através do eixo citoesquelético FAK/actina (CHALKIADAKI et. al., 2011; VOUDOURI et. al.,

2016). Adicionalmente, um CS-E obtido da cartilagem de lula foi capaz de inibir a migração de células de câncer de mama 4T1, através da inibição da via de sinalização pró-metastática Wnt/beta-catenina e colágeno tipo 1 (WILLIS & KLUPPEL, 2014), sugerindo que os GAGs atuem também intracelularmente modulando vias moleculares importantes no câncer, como vias que participam na migração celular.

No experimento de *transwell*, o sCS é capaz de inibir a migração das células de melanoma na presença de fibronectina, um importante componente da matriz extracelular. A fibronectina apresenta domínios de ligação celular e de ligação com heparina em sua estrutura, através dos quais diversas moléculas podem interagir e promover a migração celular (MISSIRLIS et. al., 2017). Uma vez que o sCS apresenta domínios estruturais semelhantes à heparina, a ideia de que esse composto possa se ligar aos domínios de ligação da heparina, presentes na fibronectina e assim inibir a migração celular, poderia ser sugerida. Contudo, esse não seria nem o único ou o mais importante mecanismo de ação antitumoral do sCS. O papel de inibição sobre a trombina exibido pelo sCS parece se destacar como uma via importante no potencial antimelanoma desse polissacarídeo.

A trombina, atua como protagonista no crescimento e disseminação do câncer sendo capaz de modular o comportamento das células tumorais, tanto diretamente, através da ativação do receptor PAR-1 ou indiretamente, gerando matrizes de fibrina (TSOPANOGLOU, N. E., & MARAGOUDAKIS, 2009; WOJTUKIEWICZ et. al., 2015). Evidências substanciais mostram que a trombina endógena, através da ativação de PAR-1, é capaz de induzir crescimento tumoral e angiogênese, bem como a adesão de células tumorais à plaquetas, células endoteliais, fibronectina e ao fator de von Willebrand, culminando assim em um resultado acumulativo de indução metastática (TSOPANOGLOU, N. E., & MARAGOUDAKIS, 2009; XIE et. al., 2016; LI et. al., 2015; ADAMS et. al., 2015; SEDDA et. al., 2014). A ativação de PAR-1 pela trombina leva à ativação de diversas vias de sinalização, incluindo fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), MAPK e Rho quinase, os quais por sua vez, promovem proliferação, migração e adesão de células tumorais (COUGHLIN,

2000). Particularmente, o aumento da expressão de PAR-1 está altamente associado à progressão do melanoma. Massi e colaboradores reportaram um aumento significativo da expressão proteica e de mRNA de PAR-1 em amostras clínicas de melanoma atípico do tipo nevo comparado com melanócitos normais. Além disso, foi demonstrado que a expressão desse receptor em células de melanoma murino está correlacionada com aumento do potencial de metástase pulmonar *in vivo* (NIERODZIK et. al., 1998; MASSI et. al., 2005). Assim, fica evidente que a regulação de PAR-1 e da trombina constitui um ponto chave no desenvolvimento do melanoma.

A regulação de PAR-1 no melanoma é promovida pelo fator transcricional AP-2 α . Em células de melanoma a análise da região promotora do gene PAR-1 revela múltiplos sítios de ligação à AP-2 α dentro da região 3' proximal, sugerindo que esse fator de transcrição regula a atividade da região promotora de PAR-1 suprimindo assim a sua expressão (TELLEZ et. al., 2003). PAR-1 por sua vez, regula a expressão da conexina Cx-43. Foi mostrado que o silenciamento de PAR-1 resulta na diminuição da expressão de CX-43 em linhagens de melanoma metastático e conseqüentemente, na diminuição da ligação dessas células à células endoteliais (VILLARES et. al., 2009). Em conjunto, essa tríade de regulação gênica parece ser um ponto importante na base molecular do melanoma, participando na modulação de outros diversos genes, mostrando-se assim, como um potencial alvo terapêutico. Desta forma, foi despertado o interesse em avaliar se o sCS seria capaz de interferir na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do melanoma em células de melanoma B16F10.

Na análise por RT-qPCR, o sCS apresentou um efeito *in vitro* significativo sobre a expressão de todos os genes avaliados, com exceção do gene AP-2 α . Em relação à PAR-1, de fato não foi possível detectar a sua expressão *in vitro* nas células de melanoma após 48h de incubação, tanto na presença ou ausência dos compostos. A expressão de PAR-1 está envolvida na progressão e no potencial metastático de vários cânceres, incluindo melanoma (TELLEZ et. al., 2003; VILLARES et. al., 2008; 2009) juntamente com a regulação transcricional de outros genes. Contudo, é importante

destacar que a maioria dos estudos com expressão de PAR-1 em melanoma relatam estudos *in vivo*. Além disso, este resultado pode ter se dado também devido ao fato de que os níveis de mRNA foram avaliados em um único dado período de tempo (48h), o que pode não ter tornado possível a leitura adequada de todos os genes, já que a expressão de alguns genes pode se dar em um período de tempo variável após um dado estímulo. Todavia, não podemos desconsiderar uma possível modulação gênica na tríade de regulação do PAR-1, visto que o tratamento com ambos sCS e heparina mostrou uma diminuição bastante significativa ($p > 0,01$) dos níveis de expressão do gene Cx-43. Esse último é considerado um gene alvo dentre as diversas vias biológicas ativadas por PAR-1 e sua expressão está relacionada com aderência e diapedese de células tumorais (BAUER et. al., 2007). Níveis diminuídos da expressão de Cx-43 podem culminar na modulação da comunicação entre as células tumorais entre si, com células endoteliais e com o meio extracelular circundante (ZHANG & ZHANG, 2017), corroborando assim com as atividades anti-clonogênicas apresentada pelo sCS.

Adicionalmente, um dos genes que apresenta altos níveis de expressão ainda nos estágios iniciais de tumorigênese e que teve sua expressão diminuída de forma significativa ($p > 0,01$) na presença do sCS e heparina é o MAPK. A via de MAPK é uma das vias mais estudadas no câncer devido ao seu envolvimento em etapas primordiais no crescimento e estabelecimento do tumor, como a proliferação, migração e adesão celular (COUGHLIN, 2000; MACFARLANE et al., 2001). A via de MAPK também está envolvida na regulação da melanogênese, a qual tem uma participação no comportamento maligno do tumor. O sCS exibiu uma atividade anti-melanogênica sobre as células de melanoma B16F10 com 52% de inibição, enquanto a heparina inibiu 57% da produção de melanina. De forma semelhante, um polissacarídeo sulfatado obtido da alga vermelha *Gracilaria fisheri* foi capaz de inibir em 57% a produção de melanina pelas células B16F10 na mesma concentração (PRATOOMTHAI et al. 2018).

A cascata de fosforilação da p38 MAPK pode ativar o fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), que por sua vez regula a

expressão de tirosinase, proteínas 1 e 2 relacionadas à tirosinase (TRP-1, TRP-2), induzindo a produção de melanina. Além disso, a quinase ribossômica S6 (RSK-1) e a cascata ERK desempenham um papel principal no controle do crescimento celular, mas nas células do melanoma B16F10, ERK e RSK-1 induzem a fosforilação de MITF e levam à sua ubiquitinação. Como resultado, o MITF ubiquitinado é regulado negativamente pela degradação mediada pelo proteossoma (HIRATA et. al. 2007; KIM et. al. 2007). Assim, reunidas essas evidências, pode-se sugerir que o sCS e a heparina sejam capazes de interferir nessa complexa cascata, inibindo a ativação do MITF via inibição da fosforilação de p38 e corroborando assim, com a modulação gênica de MAPK exibida pelo sCS.

Os eventos de proliferação, migração e adesão celular são também mediados por RhoA, uma proteína do tipo GTPase pertencente à família de proteínas Ras, que devido à sua relação próxima com o oncogene Ras tem sido amplamente estudada no câncer. A hiperregulação positiva de RhoA é predominante observada em tumores com alta incidência inflamatória como câncer de mama, pâncreas, hepatocarcinoma e melanoma, com uma forte associação entre os níveis de sua expressão e um prognóstico ruim (KLEER et. al., 2002; 2005; SUWA et. al., 1998). RhoA e seu efetor direto ROK regulam a reorganização dinâmica da rede de actina citoesquelética, levando à ativação do sistema de actina-miosina, montagem das fibras de estresse e motilidade celular, favorecendo a migração e invasão celular (AMANO et al., 1997). O sCS, mas não a heparina, mostrou efeito inibitório significativo sobre a expressão do gene RhoA em células de melanoma ($p > 0,05$). A inibição da expressão de MAPK e RhoA exibida pelo sCS, pode justificar ao menos em parte, as atividades antiproliferativa e anti-migratória aqui reportadas para esse composto, sugerindo que um dos mecanismos pelo qual o CS do camarão modula esses eventos se dê à nível molecular.

RhoA tem ainda um importante papel na resposta inflamatória, ativando o principal fator de transcrição imunológico, o NF- κ B (JOHAN & SAMUEL, 2018; SEGAIN et. al., 2003), o qual é produzido pelo gene NFKB1 e tem uma suma importância na resposta inflamatória, a qual está atrelada não somente

aos estágios iniciais da tumorigênese, mas também à progressão tumoral (RICHMOND & YANG, 2016; GRIVENNIKOV, GRETEN & KARIN, 2010). Nesse sentido, o sCS também foi capaz de modular de forma evidente a expressão do gene NFKB1 por células de melanona B16F10, enquanto que a heparina não apresentou nenhum efeito inibitório significativo. A transcrição mediada por NF- κ B é conhecida por ser um regulador chave da expressão de inúmeras quimiocinas e citocinas que influenciam as propriedades das células linfóides e mielóides no microambiente do tumor, dentre estas: IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12 e TNF- α (MURRAY, et. al., 2014). No melanoma, a secreção de TNF- α por queratinócitos juntamente com outros efetores inflamatórios contribui ainda para a tumorigênese e a proliferação de melanócitos (MARATHE et al., 2005; ULLRICH, 2005). A inibição da produção de TNF- α por células de melanoma promovida pelo sCS pode ser uma consequência do efeito modulador desse composto sobre a expressão *in vitro* de NF- κ B, sugerindo a ideia de que esse GAG seja capaz de modular a produção de citocinas à nível nuclear.

O processo inflamatório é tido como um dos principais favorecedores do câncer. Evidências suportam que uma resposta imunológica aberrante e uma homeostase alterada modulam de forma positiva a tumorigênese (GRIVENNIKOV, GRETEN & KARIN, 2010; RICHMOND & YANG, 2016). O NF- κ B é também responsável pelo recrutamento de leucócitos e ativação de macrófagos. Os macrófagos associados ao tumor são importantes reguladores da tumorigênese, sejam esses residentes no tecido de crescimento tumoral ou derivados de fontes periféricas, como a medula óssea ou baço. Embora os macrófagos sejam considerados células efectoras de defesa imunológica, estudos demonstraram um papel claro destes macrófagos nos aspectos da progressão tumoral, facilitando a invasão de células tumorais, através da sinalização parácrina de fatores de crescimento (CONDEELIS & POLLARD, 2006; CONIGLIO, 2012; QIAN & POLLARD, 2010).

Durante o desenvolvimento tumoral a ativação transcricional de NF- κ B pode ser estimulada também através da clivagem de PAR-1 pela trombina, desencadeando diversas respostas celulares inflamatórias (EBRAHIM et. al,

2017; HASSANIAN, DINARVAND, & REZAIE, 2014). A ativação de PAR-1 em células de melanoma também é capaz de hiper-regular a expressão do gene de um importante receptor pró-inflamatório, o PAFR e a secreção de seu ligante, o fator ativador de plaquetas (PAF), o que desencadeia inúmeros efeitos no microambiente tumoral. PAFR é um receptor transmembrana específico acoplado à proteína G (NAKAMURA et. al., 1991). O seu ligante, o PAF, por sua vez, ativa plaquetas, promovendo a formação de um agregado tumoral-plaquetário, além de aumentar os níveis da expressão proteica e gênica das moléculas de adesão de células de melanoma (MCAM/MUC18) (MELNIKOVA et. al., 2009; TELLEZ et al., 2007).

Todas as células de melanoma, independentemente do seu potencial metastático, expressam PAFR e secretam níveis basais de MMP-2 e MT1-MMP. No entanto, dentro do microambiente do tumoral, onde as células de melanoma entram em contato com células secretoras de PAF, como plaquetas, células endoteliais e células inflamatórias, o PAF fosforila CREB e ATF-1 através da atividade de seu receptor PARF e, então uma cascata de sinalização envolvendo p38/MAPK e PKA é conseqüentemente iniciada. PAF é um modulador direto da expressão de mediadores inflamatórios como IL-6, IL-8, IL-10, COX-2 e iNOS (GUPTA & DUBOIS, 2001; NIERODZIK et. al., 1998). Estudos também mostram que PAF promove a invasão de células de melanoma B16F10 *in vitro* (FALLANI et al., 2006).

No presente trabalho, a análise por RT-qPCR de células de melanoma B16F10 mostrou que ambos o sCS e heparina exibiram um efeito modulador sobre os níveis de expressão de PAFR, sendo que a heparina teve um efeito mais significativo ($p < 0,01$ vs $p < 0,05$). Apesar de não haver dados na literatura que reportem o efeito direto de GAGs sobre a expressão ou mesmo atividade de PAF ou seu receptor PAFR, sabe-se que as moléculas do tipo CS desempenham um papel importante na ativação plaquetária e, por isso, uma possível modulação sobre PAFR/PAF, não deve ser descartada. O CS-A é o principal GAG presente em plaquetas e pode ser encontrado tanto em α -grânulos plaquetários, sendo rapidamente liberado após ativação, como na superfície plaquetária após exposição mediada por ativação plaquetária

(DONATO et. al., 1994; WARD & PACKHAM, 1979; WOULFE et. al., 2008). Assim, é possível que as características estruturais do sCS permitam uma mimetização do CS endógeno e conseqüentemente sua interação com proteínas plaquetárias, inclusive o PAFR. Porém, a ideia de que o sCS possa estar modulando a expressão gênica de PAFR, indiretamente através da inibição da ativação de PAR-1, pela sua interação com a trombina, parece ser mais aceitável.

De fato, há uma interseção entre diversas vias fisio-patológicas na sinalização do melanoma, onde inflamação, coagulação e até mesmo a angiogênese se correlacionam. A simples interação entre plaquetas e células tumorais desencadeia a angiogênese de forma precoce e o desenvolvimento de vasos colaterais através da síntese e secreção de VEGF, PDGF, angiopoietina-1, biolipídios e PAF, mediada pela trombina, em células plaquetária e/ou tumorais (BOUCHARABA et al., 2004; LI et al., 2001; NIERODZIK & KARPATKIN, 2006; RUF & MUELLER, 2006). PAF, através da ativação de seu receptor PAFR, induz também um efeito direto sobre a expressão do principal fator pró-angiogênico, o VEGF, através da desregulação da proteína supressora de tumor p53 (KIM, SEO & KANG, 2011).

O VEGF está intimamente envolvido na angiogênese e expansão da rede de suprimento vascular, dentro e ao redor do tumor e seus altos níveis estão associados com um aumento da malignidade em tumores de melanoma (MARTÍNEZ-GARCÍA et. al., 2017). Assim, quando avaliado os níveis de mRNA do gene responsável pela angiogênese, o VEGFA em células de melanoma B16F10, o sCS foi capaz de diminuir significativamente seus níveis de expressão, de forma mais proeminente do que mesmo a heparina ($p < 0,05$ vs $p < 0,01$). Esse resultado traz uma correlação importante com a inibição dos níveis de mRNA de PAFR visto para os compostos aqui estudados. Em um estudo prévio, o sCS foi capaz de inibir em quase 100% (em uma concentração de 100µg/mL) a formação tubular por células endoteliais de coelho, *in vitro* (PALHARES, 2016). Adicionalmente, estudos mostraram que diversos GAGs são capazes de se ligar e interagir com o VEGF, porém o papel direto desses polissacarídeos sobre a expressão gênica do gene VEGFA ainda não é claro.

A expressão de VEGF também é desencadeada por PAR-1 em células de melanoma e células endoteliais. O silenciamento de PAR-1 em células de melanoma leva a níveis drasticamente diminuídos da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e VEGF (VILLARES et. al., 2011), importantes para a neovasculogênese. A capacidade metastática não somente do melanoma, bem como de outros tumores agressivos se dá pelo aumento significativo da angiogênese, e por essa razão é tida atualmente como um dos principais marcadores do câncer (HANAHAN & FOLKMAN, 1996). Assim, a habilidade do sCS em modular a expressão de genes importantes no desenvolvimento do melanoma, sugere um potencial anti-melanoma *in vitro* à nível molecular, ainda em um curto período de tratamento (48h).

A complexa relação que o câncer constrói durante seu desenvolvimento com os mais diversos sistemas dentro de um organismo é umas das principais características para o sucesso da progressão tumoral. Assim, ao se avaliar o efeito antitumoral de um possível agente terapêutico, o uso de modelos *in vitro* se torna limitado para uma compreensão mais completa e fidedigna de uma patologia tão sofisticada quanto o câncer. Nesse sentido, foi despertado nosso interesse em verificar se o sCS seria capaz de manter os potenciais antitumorais em um modelo de melanoma *in vivo*. Para tanto, camundongos C57bl/6 foram inoculados com células de melanoma B16F10, para o desenvolvimento de um tumor sólido e, em seguida submetidos ao tratamento com sCS ou heparina nas doses de 300 µg/Kg/animal, três vezes por semana.

Após 25 dias de experimento, 30% dos animais tratados com sCS não apresentaram crescimento tumoral visível, enquanto que os tumores que se desenvolveram nesse período exibiram um peso médio de 0,4g contra um peso médio de 3,85g no grupo de animais tratados apenas com injeções placebo de PBS (controle positivo). Essa diferença representa uma diminuição de 90% no crescimento tumoral em animais tratados com sCS quando comparado ao grupo controle. Para o grupo de animais submetidos ao tratamento com a heparina, essa redução chegou à 71%. Uma potente inibição do crescimento de tumores de melanoma *in vivo* foi também observada para um composto híbrido do tipo Hep/HS obtido da mesma espécie de camarão (*L. vannamei*),

onde o potencial de inibição chegou à 97% (BRITO et. al., 2018), mostrando um potencial antitumoral interessante de compostos provenientes desse crustáceo.

Um dos maiores indicativos de agressividade tumoral é a capacidade de formação de focos metastáticos. Por isso, foi também observado o eventual desenvolvimento de focos metastáticos nos animais submetidos ao experimento, particularmente a metástase pulmonar. A análise histológica revelou que em todos os grupos de animais, com exceção para o grupo sem indução tumoral (controle negativo), foram identificados infiltrado inflamatório e presença de melanócitos nas adjacências dos alvéolos pulmonares, sugerindo presença de metástase pulmonar pelas células de melanoma. Apesar desses achados histológicos, ao se observar a macro-morfologia dos pulmões, foi possível detectar macroscopicamente, focos metastáticos apenas nos pulmões de animais dos grupos controle positivo e do grupo de tratamento com heparina, sugerindo uma área metastática menos evidente em pulmões de animais submetidos aos tratamento com o CS do camarão. Um CS-E (presença de GalNAc 4,6-O-sulfato) mas não CS-A ou CS-C foi capaz de modular o crescimento e metástase de tumor de mama *in vivo*, através da inibição das interações de P-selectina presentes na superfície das células tumorais (MONZAVI-KARBASSI et. al., 2007). Foi reportado também que um CS fucosilado de baixo peso molecular obtido do pepino do mar *Cucumaria frondosa*, o qual apresenta peso molecular idêntico ao sCS (~12KDa) foi capaz de inibir de forma proeminente a metástase tumoral *in vivo* (BORSIG et. al., 2007). Juntos, esses resultados sugerem que moléculas de CS que apresentam uma estrutural não usual, parecem atuar sobre eventos da metástase tumoral.

Os mecanismos inerentes ao desenvolvimento do câncer, surgem ainda nos estágios iniciais da tumorigênese. Melanomas totalmente evoluídos são capazes de acumular múltiplas mutações, permitindo que essa patologia tenha uma maquinaria eficaz para seu estabelecimento com sucesso. As mutações somáticas mais presentes em melanomas tanto decorrentes de incidência solar crônica ou independente da exposição solar crônica, afetam genes das

principais vias de sinalização responsáveis pela proliferação, crescimento e metabolismo, identidade celular, resistência à apoptose, controle do ciclo celular e controle da vida útil replicativa da célula (HODIS et. al., 2012; HORN et. al., 2013; HUANG et. al., 2013). Diversos dados apontam que o uso de terapias antitumorais que tenham como mecanismo de ação modular processos fundamentais para o crescimento do tumor, como proliferação e migração, possibilitam um prognóstico mais promissor e culminam em aumento da taxa de sobrevida (FLAHERTY et. al., 2012; LONG et. al., 2014; LARKIN et. al., 2014; ROBERT et. al., 2015).

Além da redução do crescimento tumoral, quando comparado ao grupo controle, o tratamento com sCS permitiu o aumento da taxa de sobrevida em 70% dos animais, trazendo a hipótese de que esse GAG poderia estar modulando negativamente mecanismos envolvidos nos estágios basais do melanoma. Estudos mostram que a terapia com uso concomitantemente de potentes inibidores de BRAF como Dabrafenib e Trametinib mostrou uma melhora significativa em pacientes com melanoma metastático portadores de mutações BRAF^{V600E} ou BRAF^{V600K} (ROBERT et. al., 2015). Pacientes com essas mutações frequentemente apresentam resistência à terapias padrões quimioterápicas. O gene BRAF tem como produto uma proteína quinase da família RAF, responsável pela regulação da via de sinalização celular MAPK. Essa por sua vez, é uma das vias mais basais no desenvolvimento tumoral, responsável pela alta taxa de proliferação celular. A resistência adquirida aos inibidores de BRAF frequentemente se desenvolve através da reativação da sinalização de MAPK, resultando em uma sobrevida média livre de progressão de 6 a 8 meses (SOLIT & ROSEN, 2011; SHI et. al., 2014; VAN ALLEN et. al., 2014). Nesse sentido, o uso de agentes antitumorais capazes de atuar nessas vias basais do desenvolvimento do câncer se torna uma estratégia atrativa, não somente para limitar a evolução da doença e o processo metastático, mas também para desacelerar ou mesmo impedir o crescimento do tumor.

Por essa razão, foi avaliado *in vivo*, se o sCS estaria exibindo esse potencial antitumoral através da modulação à nível molecular, de etapas cruciais no desenvolvimento do melanoma. Para tanto, avaliação da expressão

gênica por RT-qPCR em amostras de tumores e pulmões, excisados dos animais submetidos ao ensaio de tumorigênese, foram realizadas. As análises das secções de tumores, mostraram que nos animais tratados com sCS e heparina houve uma diferença significativa ($p < 0,05$; $0,001$; e $0,001$) da expressão de praticamente todos os genes, quando comparado ao animais do grupo controle positivo (sem tratamento), exibindo um perfil de modulação gênica diferente em alguns aspectos daquele apresentado na análise *in vitro*. De forma Interessante, a expressão de MAPK foi significativa apenas nos tumores de animais tratados com sCS ($p < 0,05$). Mutações pontuais em lesões intermediárias frequentemente incluem mutações conhecidas por ativar a sinalização MAPK, tais como mutações V600K, K601E e G469A no gene BRAF e Q61R e Q61K do gene NRAS, além de deleções no gene NF1 (SHAIN & BASTIAN, 2016). Devido ao seu papel nos processos de proliferação, migração e diferenciação celular, a via de sinalização da MAPK é tida como o principal ponto de iniciação da carcinogênese e por isso tem grande importância como alvo terapêutico no câncer. Assim, esses dados sugerem uma correlação entre o efeito inibitório sobre o crescimento tumoral *in vivo* apresentado pelo sCS e sua modulação dos níveis de mRNA de MAPK.

Nos últimos anos estudos têm mostrado que o gene PAR-1 é capaz de ativar diversas proteínas do tipo G (G α q, G α i, G α 12,13 e G β \gamma), desencadeando uma cascata de transdução de sinal em vias como a da MAPK, PI-3, Rho quinases, bem como o aumento de Ca⁺ intracelular e ativação da proteína quinase C (PKC) (BAHOU, 2003; COUGHLIN, 2005; VILLARES, ZIGLER & BAR-ELI, 2011). No modelo *in vivo*, a expressão do gene PAR-1 foi não somente detectada, bem como o sCS foi capaz de diminuir seus níveis de mRNA em 89% ($p < 0,001$), enquanto que a heparina diminuiu em 64% ($p < 0,05$). Esses achados são corroborados pelos resultados obtidos através da análise quantitativa de PAR-1 por imuno-histoquímica em cortes de tumores murinos, onde os tumores de animais tratados com sCS ou heparina apresentaram níveis diminuídos para marcação de PAR-1 em torno de 40%, quando comparado com os tumores de animais do grupo controle positivo.

Atualmente, o papel de PAR-1 como um importante fator na progressão do melanoma é bem documentado. A superexpressão de PAR-1 é predominantemente observada em amostras de tumores de melanoma maligno e em lesões metastáticas, quando analisadas por imuno-histoquímica (MASSI et. al., 2005). Em um modelo de metástase pulmonar em camundongos usando células B16F10 transfectadas com o gene PAR-1, foi observado um aumento de 40 vezes na metástase pulmonar (NIERODZIK et. al., 1998). Além disso, o aumento na expressão de PAR-1 em células de melanoma metastático é mais evidente do que em células não metastáticas (TELLEZ et. al., 2003), mostrando a participação desse receptor de protease também na agressividade do melanoma.

Dentro da base molecular do melanoma, PAR-1 parece desempenhar uma função central, coordenando a modulação da expressão de outros genes importantes para o desenvolvimento tumoral e metástase. Como mencionado anteriormente, PAR-1 juntamente com os genes AP-2 α e Cx-43 formam uma tríade crucial de regulação gênica no melanoma. Li e colaboradores, mostraram pela primeira vez que a região promotora do gene PAR-1 apresenta múltiplos sítios de ligação ao fator transcripcional AP-2 α e SP-1, além de dois motivos de ligação sobrepostos para AP-2 α e SP-1 dentro da região 3' proximal (LI et. al., 1996). O silenciamento de AP-2 α leva à um aumento da expressão de PAR-1, além de favorecer a transição da fase de crescimento radial para a fase de crescimento vertical no melanoma (GERSHENWALD et. al., 2001; HUANG et. al., 1998; JEAN et. al., 1998), desempenhando assim um *feedback* negativo na regulação do receptor de protease. No melanoma, baixos níveis de AP-2 α permitem a ligação de SP-1 ao seu motivo de ligação presente na região promotora de PAR-1, resultando na ativação gênica deste (TELLEZ et. al., 2003). AP-2 α por sua vez, é capaz ainda de interagir com RNA e promover regulação da progressão do câncer, crescimento tumoral, metástase, resistência a medicamentos, metabolismo e até mesmo a ocorrência de anomalias congênitas. Em células de melanoma especificamente, AP-2 α consegue interagir com dois miRNA tidos como vitais para o desenvolvimento cancerígeno: miR-214 e miR-638. miR-214 é capaz de modular AP-2 α e

contribuir de forma positiva para a progressão do melanoma, enquanto o miR-638 é superexpresso em melanoma metastático e, juntamente com o AP-2 α , são responsáveis por um *feedback* regulatório com um caráter duplo-negativo (BHATTACHARYA et. al., 2015; GERSHENWALD et. al., 2001; PENNA et. al., 2007). Além disso, a regulação negativa de AP-2 α associada à supressão da apoptose e autofagia celular, mediada por p53, favorece a metástase (KOLAT et. al., 2019). Em acordância com esses fatos, foi observado um aumento dos níveis de mRNA para AP-2 α nos tumores de animais dos grupos tratados com sCS e heparina, o que corrobora com a diminuição da expressão de PAR-1. Por outro lado, o sCS demonstrou efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) sobre os níveis de mRNA de Cx-43, que por sua vez é diretamente relacionada ao aumento de PAR-1 em células de melanoma metastático (ARUMUGAM et. al., 2008).

A superexpressão da conexina Cx-43 tem sido associada à diversos canceres, incluindo o melanoma, no qual atua facilitando a adesão de células de melanoma à células endoteliais, promovendo extravasamento do tumor (EL-SABBAN & PAULI, 1991). Villares e colaboradores mostraram pela primeira vez que PAR-1 é capaz de regular a expressão de Cx-43, somando mais uma função regulatória desse gene no melanoma. Ao silenciar PAR-1 em células de melanoma metastático foi observada uma diminuição da expressão de Cx-43 com consequente diminuição da adesão de células de melanoma à células endoteliais (VILLARES et. al., 2009). Assim, dentro desse contexto de regulação translacional, o efeito do sCS sobre a expressão desse conjunto de genes ainda não está totalmente esclarecido. A regulação gênica promovida por sCS pode ter se dado de forma indireta, através da inibição de PAR-1 com uma consequente modulação de AP-2 α e Cx-43 ou ainda agindo diretamente sobre cada gene.

sCS e heparina foram capazes de reduzir também (75% e 41% de inibição, respectivamente) os níveis de expressão de VEGFA quando comparados ao grupo controle. VEGFA é responsável pela produção do principal fator pró-angiogênico, o VEGF. A angiogênese possibilita a expansão da rede de suprimento sanguíneo necessário para o desenvolvimento do

tumor, além de transportar as células tumorais, permitindo a colonização de tecidos distantes ao tumor e uma consequente metástase (HANAHAN & FOLKMAN, 1996). O papel da angiogênese no câncer é tão importante que a presença de formações de novos vasos em amostras de tumores é tido como um mau prognóstico de pacientes oncológicos. Durante o curso da progressão e disseminação do melanoma, o VEGF é superexpresso tanto por células de melanoma quanto por células endoteliais adjacentes ao tumor. Apesar de o VEGF ter um efeito predominantemente parácrino, a presença do seu receptor, o VEGFR na superfícies de outras células além de células endoteliais, incluindo as células de melanoma, sugere um sistema de atuação também autócrino (MARTÍNEZ-GARCÍA et. al., 2017). Adicionalmente, células inflamatórias que infiltraram no tecido tumoral também são capazes de produzir VEGF, sintetizando um microambiente tumoral favorável. Toda essa produção aumentada de VEGF leva à um aumento no número de vasos ao redor do tumor e vasos recém-formados apresentam uma maior hiper-permeabilidade, a qual é um fator crucial no processo metastático do melanoma cutâneo primário (SALVEN, HEIKKILA & JOENSUU, 1997). Um estudo de coorte realizado com pacientes com melanoma maligno mostrou que o aumento da concentração sérica dos fatores VEGF, bFGF e da citocina IL-8 estão associados com uma progressão tumoral avançada e baixa taxa de sobrevivência (UGUREL et. al., 2001)

Embora não tenha sido detectada uma diminuição significativa na marcação de VEGF por imuno-histoquímica, nos cortes de tumores para os grupos de tratamento, quando comparados ao controle positivo, o proeminente efeito inibitório sobre a expressão de VEGFA pelo sCS pôde ser corroborado pela diminuição dos níveis plasmáticos de VEGF. O sCS foi capaz de inibir, em quase 90%, os níveis de VEGF circulante no sangue dos animais, quando comparado com o controle positivo, enquanto o grupo que recebeu tratamento com heparina diminuiu em 80% a secreção do fator. Sabe-se que GAGs são capazes de se ligar e interagir com diversos fatores de crescimento (SHIPP & HSIEH-WILSON, 2007) e dessa forma, competir pela ligação com seus respectivos receptores, inibindo assim uma possível resposta celular. Um

composto tipo heparina também obtido do cefelatórax do camarão *L. vannamei* mostrou capacidade de interagir com os fatores VEGF, FGF-2 e EGF, além de inibir a proliferação de células endoteliais (DREYFUSS et. al., 2010), sugerindo um possível mecanismo de interação e inibição direta do VEGF para o sCS. Contudo, os dados mostrados aqui também podem sugerir que ambos o sCS e heparina poderiam estar promovendo um efeito anti-angiogênico através da regulação gênica de VEGFA, e conseqüentemente, levando à uma diminuição da produção de VEGF circulante. Além disso, o VEGF se adiciona à lista de genes que sofre modulação por PAR-1, onde sua ativação leva à superexpressão e secreção de não somente VEGF bem como outros fatores pró-angiogênicos como IL-8, MMP-2 e PDGF2 (TELLEZ & BAR-ELI, 2003), colocando cada vez mais o papel de PAR-1 no foco da biologia do desenvolvimento do melanoma.

O VEGF por sua vez, media uma importante intersecção entre angiogênese e o sistema de coagulação. Como citado anteriormente, relatos mostram que PAF está intimamente envolvido na resposta angiogênica tumoral, sendo capaz de ativar células endoteliais diretamente além de induzir a expressão de fatores angiogênicos como VEGF e assim estimular a angiogênese (BUSSOLATI et. al., 2000; AXELRAD et. al., 2004; CAMUSSI et. al., 1995). Nas últimas décadas, o papel de PAFR e PAF no melanoma vem sendo estudado além de sua função plaquetária e importantes eventos da progressão do melanoma foram atribuídos à essas moléculas. Em camundongos transgênicos para PAFR, foram observadas alterações progressivas hiperproliferativas na epiderme, duas semanas após o nascimento. A hiperplasia dos queratinócitos foi acompanhada de hiperpigmentação e aumento do número de melanócitos dérmicos no ouvido e cauda dos animais, com conseqüente desenvolvimento de tumores de melanoma no final da vida (SATO et. al., 1999). Em outro estudo, a inibição da atividade do PAF por meio da superexpressão de PAF-acetil-hidrolase em células de melanoma B16F10 levou à uma diminuição significativa na vascularização e crescimento do tumor, permitindo maior taxa de sobrevivência dos animais (BIANCONE et. al., 2003). Esses resultados sugerem que uma

atividade antagonista do PAFR poderia atuar como um ponto de intervenção durante a disseminação vascular ou crescimento de tumores e/ou metástase. Essa ideia é reforçada pela potente inibição dos níveis de mRNA do gene PAFR *in vivo* (85%) e a inibição do crescimento tumoral mediados pelo sCS. Diferentemente dos resultados *in vitro*, a heparina não demonstrou efeito significativo sobre a expressão desse gene, o que pode estar relacionado com a biodisponibilidade da heparina de baixo peso molecular na circulação sanguínea dos animais.

Na pele humana, sabe-se que os diferentes tipos de células desempenham um papel significativo na regulação da homeostase da pele e no comportamento dos melanócitos residentes, bem como no crescimento do melanoma e na invasão maligna local. A homeostase e o número de melanócitos são controlados pelos queratinócitos vizinhos através de uma adesão mediada por E-caderina (LEE & HERLYN, 2006). Essenciais na tumorigênese do melanoma, queratinócitos e células estromais da córnea secretam PAF em resposta à exposição aos raios UV (MARATHE et al., 2005), o que aponta este fator como um importante indutor carcinogênico no melanoma.

Além da angiogênese e ativação plaquetária, o processo inflamatório é um resposta constante não somente durante o desenvolvimento tumoral, mas apontado também como um desencadeador da tumorigênese. A GTPase RhoA tem um papel importante na resposta imune dentro do ambiente tumoral do melanoma, estimulando a proliferação e migração celular além de ativar o fator transcricional NF- κ B. Um estudo *in vivo* sugeriu que as proteínas do tipo Rho podem induzir um efeito transformador que leva a um fenótipo maligno em células normais. De fato foi demonstrado que inibidores de Rho GTPases favoreceram um potencial anti-melanoma mediado através de uma resposta imune adaptativa (TILKIN-MARIAME et al., 2005; SARRABAYROUSE et al., 2007, 2010). O perfil de modulação sobre a expressão de RhoA *in vivo* para os tumores, foi mais proeminente para o sCS quando comparado com os resultados *in vitro*, chegando a inibir em 77% seus níveis no modelo *in vivo*. Já a heparina, diferentemente dos resultados apresentados *in vitro* foi capaz de

produzir um efeito modulador significativo sobre os níveis de mRNA de RhoA. Essa diferença na modulação da expressão de RhoA nos diferentes modelos experimentais, nos leva a crer que os mecanismos inerentes à regulação gênica da resposta imune no melanoma não se dê de forma isolada, dependendo também da presença de células inflamatórias no microambiente tumoral, as quais obviamente não têm uma participação no modelo *in vitro*.

Como previamente discutido, RhoA também é capaz de induzir a ativação de NFκB1, que por sua vez é responsável por toda a regulação da resposta imune inata e sua ativação exacerbada no melanoma está associada com a presença de mutações do tipo BRAF^{V600E} (GUARNERI et. al., 2017). Um CS obtido do pepino do mar *Stichopus japonicus* foi capaz de modular o eixo de sinalização NF-κβ/fator tecidual/fator Xa no melanoma *in vivo* (ZHAO et. al., 2013), mostrando que moléculas de CS são capazes de atuar regulando vias de sinalização importantes para o desenvolvimento tumoral. O fato de que o sCS e a heparina foram efetivos em diminuir os níveis de mRNA de NFκB1 de forma significativa tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugere que esses compostos atuem em diferentes alvos inflamatórios, promovendo um efeito multi-sinalizador na inflamação. Em um trabalho anterior, o sCS apresentou um efeito anti-inflamatório *in vivo*, pela inibição das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6, e TNF-α, além de diminuir os níveis de óxido nítrico *in vitro* (PALHARES et. al., 2019).

As células de melanoma produzem uma grande variedade de citocinas, as quais os tipos e níveis variam de acordo com o estágio tumoral (RICHMOND et al., 2009). Nevos e melanomas primários pouco espessos (<1 mm) expressam baixas quantidades de TNF-α, TGF-β, IL-8 e de receptores de TGF-β, por exemplo. À medida que o tumor expande, tornando-se mais espesso, é observada uma hiperregulação de IL-1α, IL-1β, IL-6 e seu receptor, IL-8, TNF-α, TGF-β e seu receptor, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e seu receptor, como bem como fator de células-tronco (SCF) (MORETTI et al., 1999). Essas citocinas são também secretadas por células adjacentes ao tumor e atuam favorecendo o microambiente tumoral. TNF-α e IL-1 β secretados por macrófagos, por exemplo, induzem o aumento

da produção de IL-8 e VEGF em células de melanoma, mediando a angiogênese e a remodelação tecidual. (TORISU et al., 2000). Assim, TNF- α e IL-1 β destacam-se como efetores na progressão tumoral, e por essa razão seus níveis plasmáticos foram quantificados a partir do sangue dos animais. Quando comparados aos animais do controle positivo, os animais tratados com o sCS ou heparina mostraram níveis significativamente reduzidos de IL-1 β ($p < 0,01$), e especialmente de TNF- α ($p < 0,001$) circulante no sangue durante o desenvolvimento do melanoma.

Apesar de dados na literatura mostrarem um papel ambíguo do TNF- α no melanoma, ora exibindo altos níveis em melanoma agressivos, ora sendo relatado baixos níveis nesse tipo de câncer (DONIA, KJELDTSEN & SVANE, 2015), nossos resultados sugerem que esse efector atue como um facilitador da progressão do melanoma. Foram encontrados níveis 55% maiores de TNF- α no plasma de animais com tumores desenvolvidos (controle positivo) e submetidos ao tratamento com placebo, do que no grupo de animais saudáveis (controle negativo). Esses achados por sua vez, estão de acordo com dados mais recentes que reportam uma estreita relação de elevadas quantidades de TNF- α circulante com um aumento do risco de formação e desenvolvimento de tumores *in vivo* (LEBREC et. al., 2015).

O perfil de expressão gênica encontrado para as amostras de pulmão dos animais submetidos ao modelo de melanoma, sugerem uma atuação de sCS também em etapas da metástase tumoral. Assim como na análise das secções dos tumores, os níveis de expressão do gene PAR-1 no pulmão se mantiveram consideravelmente menores nos grupos de tratamento com sCS e heparina, apresentando uma redução em torno de 70% nos níveis de mRNA de PAR-1 para ambos os tratamentos, quando comparados com amostras do controle positivo. De forma interessante, quando comparado ao grupo controle, AP-2 α exibiu um aumento na expressão de mais de 3 vezes (aumento de 336%) no grupo de animais tratados com sCS e 2,6 vezes no grupo de tratamento com a heparina nas amostras pulmonares. No entanto, ambos sCS e heparina não foram capazes de modular a expressão de Cx-43 no pulmão de forma significativa. Como esclarecido anteriormente, altos níveis de expressão

de AP-2 α correlacionam diretamente com um *feedback* negativo sobre a regulação da expressão de PAR-1. Esse efeito pôde ser observado não somente sobre as baixas quantidade mRNA de PAR-1 no pulmão mediadas pelos sCS e heparina, mas também pela diminuição considerável da marcação por imuno-histoquímica do receptor PAR-1 nas secções de pulmões de animais tratados com os compostos, trazendo a ideia de que o mecanismo anti-PAR-1 apresentado pelo sCS e heparina pode ser também o responsável pela diminuição da metástase *in vivo*.

Em amostras pulmonares o efeito do sCS sobre a modulação da expressão de MAPK foi mais proeminente do que aquele observado para amostras de tumores, enquanto a heparina continuou sem apresentar qualquer modulação significativa. Esse dado pode trazer uma correlação com os achados histológicos dos tecidos pulmonares dos animais tratados com sCS, onde uma menor presença de infiltrado inflamatório e células de melanoma nas adjacências dos alvéolos pulmonares foi relatada, quando comparado com amostras de animais do grupo controle. Além disso, devido ao papel regulador que PAR-1 exerce sobre MAPK, a inibição da sua expressão mediada pelo sCS pode estar contribuindo para níveis diminuídos de mRNA de MAPK.

A iniciação metastática está associada, dentre outros, com genes da família de proteínas Ras, como o RhoA (CHIANG & MASSAGUE, 2008) e PAF (MELNIKOVA & BAR-ELI, 2009). Em um modelo de metástase tumoral em camundongos nude, RhoA promoveu um aumento do crescimento tumoral e um alto potencial de proliferação tumoral, através de um aumento das proteínas AK, MMP-1 e MMP-9 (FARIED et. al., 2006). Curiosamente, neste trabalho, apenas a heparina foi capaz de modular a expressão de RhoA nos tecidos pulmonares. Porém, sobre os níveis de mRNA de PAFR, o sCS mostrou uma potente diminuição de 87%, quando comparado à amostras do controle positivo. O papel de PAFR no melanoma foi demonstrado a primeira vez por IM e colaboradores em 1996, onde injeções de inibidores de PAFR em camundongos inoculados com células B16F10, foram capazes de diminuir a metástase pulmonar induzida por IL-1 α e TNF- α , sugerindo o papel de PAF e seu receptor na colonização pulmonar (IM et. al., 1996). Posteriormente, foi

demonstrado ainda que a sedimentação de células B16F10 em pulmões de ratos é dependente da expressão de MMP-9 no tecido pulmonar, a qual foi induzida por uma injeção intraperitoneal de PAF (KOET al., 2007).

Durante a metástase PAF também tem uma participação direta na secreção de citocinas através da ativação de NF- κ B, que é ativado ainda pela presença de outros mediadores inflamatórios no microambiente tumoral (MANTOVANI et al., 2008). A via ERK1/2/p38/MAPK/NF- κ B é de extrema importância na metástase, induzindo a ativação de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, capazes de degradar a membrana basal, matriz extracelular e induzir a migração de células tumorais, além de induzir a ativação de células inflamatórias e secreção de citocinas pró-inflamatórias/tumorais (HUANG, HUANG & DENG, 2012; AL, SHARAF & LUQMANI, 2011; REDDY, NABHA & ATANASKOVA, 2003). Assim, o efeito anti-metastático do sCS também pôde ser demonstrado pela diminuição da expressão de NF κ B1 e PAFR nas amostras de pulmões de forma bastante significativa ($p > 0,01$), chegando à 79% e 87% de inibição, respectivamente.

Adicionalmente, ambos sCS e haptarina foram eficientes em diminuir não somente os níveis de expressão de mRNA de VEGFA nos pulmões dos camundongos de forma significativa ($p > 0,05$), mas também em reduzir os níveis de VEGF detectados por imuno-histoquímica nos tecidos pulmonares. Esses resultados apresentam uma grande importância no contexto antitumoral, já que o aumento da densidade micro-vascular tumoral está associado a uma maior taxa de metástase (BRONKHORST et. al., 2011) e mortalidade

no melanoma (FOSS et. al., 1999; MAKITIE et. al., 1996). Uma vez que a metástase no melanoma ocorre exclusivamente por via hematogênica, é lógico presumir uma relação entre o crescimento de vasos intra-tumorais e a disseminação sistêmica do tumor. Por isso, atualmente a terapia anti-angiogênica se tornou um dos alvos no tratamento do melanoma, bem como da sua metástase. Um estudo recente relatou uma melhora considerável na eficácia do tratamento do melanoma, utilizando um inibidor de VEGF (PIPERNO-NEUMANN et. al., 2016). O interesse científico na vascularização

tumoral aumentou recentemente, à medida que novos alvos vêm sendo caracterizados, prometendo mais uma abordagem terapêutica no melanoma. As atividades anti-angiogênicas exibidas pelo sCS aqui, o colocam como um interessante alvo também na terapia focada na angiogênese do melanoma.

Por fim, assim como nas demais etapas da progressão tumoral no melanoma, PAR-1 tem uma participação direta, regulando também os genes RhoA, PAFR, NFKB1 e VEGFA no contexto da metástase. Apesar de o sCS e heparina terem exibido resultados diretamente sobre a expressão de vários genes relacionados à metástase no melanoma, não podemos descartar a possibilidade de que esses genes tenham sofrido modulações por outros genes e fatores transcricionais durante o estabelecimento da metástase, e por isso mais estudos acerca do papel desses GAGs na biologia molecular do melanoma precisam ser conduzidos. A trombina é a principal responsável pela ativação de PAR-1 e conseqüentemente, por seus efeitos biológicos no câncer. Considerando o alto potencial inibitório do sCS sobre os níveis proteicos e de mRNA de PAR-1 no melanoma, bem como sua atividade anti-trombina previamente reportada (PALHARES et. al., 2019), é possível sugerir que o mecanismo pelo qual esse composto exerce o efeito antitumoral seja através da inibição de PAR-1, tanto de forma dependente da inibição da trombina ou agindo diretamente sobre a expressão do receptor e seu produto.

Ao longo dos anos, diversos estudos da biologia celular revelaram que os glicosaminoglicanos estão dentre as macromoléculas que afetam as funções e propriedade das células, agindo sobre receptores celulares ou através de interações com fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. As variações estruturais apresentadas pelos GAGs em diversas condições patológicas, em particular no câncer, colocam essas moléculas como importantes biomarcadores e alvos terapêuticos. Para o caso específico de PAR-1, dados na literatura sobre a relação deste receptor com moléculas tipo GAG ainda são extremamente escassos. Um estudo mostrou que a heparina e uma heparina de baixo peso 2,3-O-desulfatada, inibiram a permeabilidade de células endoteliais em capilares pulmonares, induzida por trombina, através de PAR (GONZALES et. al., 2014). Esse mesmo estudo sugeriu ainda que, além da

bem estabelecida capacidade que a heparina apresenta de se ligar e inibir a trombina, promovendo assim a modulação de seus efeitos, que esse GAG também seria capaz de se ligar diretamente ao receptor PAR-1.

Do ponto de vista estrutural, GAGs são moléculas com alta eletronegatividade e por isso, uma gama variada de proteínas biológicas são capazes de interagir e se ligar às suas estruturas. Proteínas capazes de se ligar à heparina expressam motivos de ligação à heparina lineares que apresentam sequências conservadas de aminoácidos básicos e hidropáticos em padrões específicos (GREEN et. al., 2013; SOBEL et. al., 1992; SOMLYO & SOMLYO, 2003). A região de ligação aniônica no exosítio II dessas proteínas, contém um motivo estrutural (-B-X-B-B-) que se assemelha à sequências encontradas em outros peptídeos e proteínas de ligação à heparina (CARDIN et. al., 1991; DE CRISTOFARO & DE CANDIA, 2003). Gonzales e colaboradores identificaram um motivo semelhante (²⁵RARR²⁸) na parte N-terminal de PAR-1, e sugeriram que as moléculas de heparina poderiam se ligar diretamente à esse sítio de ligação. Além disso, essa ligação poderia ainda interferir com a clivagem de PAR-1 mediada pela trombina, uma vez que o sítio de clivagem (Ser⁴²) está localizado nas proximidades do suposto local de ligação à heparina e poderia ser mascarado pela molécula de heparina (GONZALES et. al., 2014). Considerando o potencial multi-facetário do sCS sobre o PAR-1 descrito no presente trabalho, a hipótese de interação sugerida por Gonzales e colaboradores, poderia ser considerada como uma explicação para os mecanismos do sCS sobre o melanoma, a ser estudada.

Vários estudos mostram o papel da superexpressão de cadeias de CS em diferentes tipos de câncer. A análise estrutural de cadeias de CS/DS presentes em células de carcinoma de pulmão relevaram que há uma maior proporção de resíduos disulfatados ΔUA-GalNAc-4,6-O em células com alto potencial metastático quando comparado com células com baixo potencial metastático (LI et. al., 2008). Esse resíduo é característico de cadeias tipo CS-E e também foi encontrando em maior proporção em células de osteosarcoma murino com capacidade metastática (BASAPPA et. al., 2009). No melanoma, CS-A leva à formação de um complexo triplo composto por PGCS de

melanoma, a MMP de membrana tipo 3 (MT3-MMP) e a pro-MMP-2, levando à ativação da MMP-2, uma das mais importantes enzimas de degradação da matriz na cascata metastática (IIDA et. al., 2007). A expressão de PGCS de melanoma estimula ainda a ativação constitutiva da via ERK1/2, a qual induz crescimento e motilidade celular (YANG et. al., 2009). Nesse sentido, moléculas que se assemelham estruturalmente à esses GAGs poderiam se ligar à diferentes proteínas fisiológicas, funcionando como miméticos de PGCS e modular assim suas funções.

Dentre essas moléculas, CS exógenos parecem regular vias de sinalização celular importantes na patogênese do câncer. Cadeias de CS supersulfatadas e um CS fucosilado isolado de pepino do mar mostraram um efeito inibitório nos eventos mediados por *P*-selectina durante a metástase tumoral (KAWASHIMA et. al., 2002; BORSIG et. al., 2007). Em outro estudo, um CS isolado do pepino do mar *Ludwigothurea grisea* predominantemente 6-O-sulfatado, porém com uma substituição na posição 3-O do GlcA apresentando ramificações do tipo 2,4-disulfatado α -L-fucopiranosose foi capaz de inibir a metástase tumoral e inflamação *in vivo*, através do bloqueio da interação dependente de *P*- e *L*-selectinas com ligantes contendo sialyl-Lewis em sua estrutura. As ramificações de fucose sulfatada presentes nesse CS se assemelham estruturalmente aos motivos presentes em glicanos de leucócitos e células tumorais, que contêm sialyl-Lewis em sua estrutura (BORSIG et. al., 2007). Assim, esse GAG funcionaria como uma molécula mimética de glicanos importantes no câncer que ao interagir com estes, permite o bloqueio das suas funções por um mecanismo de competição.

Nesse sentido, cadeias de CS-E também são capazes de interagir com membros da importante família de fatores de crescimento FGF, os quais desempenham papéis cruciais no desenvolvimento, manutenção e reparo de tecidos, e todos os membros da família têm uma propriedade de ligação à heparina. Deepa e colaboradores mostraram que FGF-2 e FGF-10 se ligam à cadeias de CS-E com menor afinidade em comparação com heparina (com base nos valores de K_d), enquanto que para o FGF-18 essa afinidade de ligação é tão forte quanto à heparina (DEEPA et. al., 2002). A razão para essa

diferença de afinidade dos diferentes ligantes ainda não é totalmente clara. Quando comparados os domínios de ligação à heparina dos membros da família FGF, foi observada uma distribuição semelhante de resíduos de aminoácidos básicos. A única característica marcante diferente entre os membros da família FGF é a presença do resíduo Cys¹³⁷ dentro do domínio de ligação à heparina (PATRIE et. al., 1999). O fato de que o CS-E se liga com alta afinidade à outros membros da família FGF, quando comparado com a heparina, pode estar correlacionado com um perfil estrutural diferente da heparina, levando à formação de diferentes interações com os aminoácidos presentes em cada FGF, em especial o resíduo Cys¹³⁷. De forma contrária, cadeias de CS-E obtidas de cartilagem de lula se ligam especificamente à fatores importantes na adesão celular como Midkine (MK) e pleitropina ($K_d = 61.6$ e 11.4 nM, respectivamente) com uma afinidade de ligação maior do que a ligação com a heparina ($K_d = 204$ e 16.1 nM, respectivamente) (UEOKA et. al., 2000).

Esses dados sugerem que a especificidade de interação de moléculas de CS com diferentes ligantes biológicos pode variar de acordo com condições físiopatológicas específicas, e parecem apresentar critérios de ligação diferentes daqueles apresentados pela heparina, o que poderia explicar em parte, o efeito geral mais ameno da heparina sobre as atividades antitumorais descritas neste trabalho, quando comparado ao sCS. Outra possível explicação, ao menos para os efeitos *in vivo*, seria que as moléculas de heparina de baixo peso molecular (HBPM), apresentam uma desvantagem do ponto de vista farmacológico quando comparado ao sCS. As propriedades farmacocinéticas da HBPM resultam em uma maior biodisponibilidade, meia-vida plasmática e regularidade da resposta anticoagulante, contudo tais propriedades são apresentadas devido ao fato de que as HBPM se ligam com menor afinidade à proteínas do plasma, à células sanguíneas e ao endotélio (HIRSH, 1993), limitando assim seus demais efeitos biológicos.

Outro ponto importante a ser abordado é a relação entre estrutura e função de GAGs. A heparina é o GAG que apresenta naturalmente o maior grau de sulfatação, e por isso diversos estudos de GAGs no câncer focam

frequentemente nesta característica estrutural, trazendo a relação entre alto grau de sulfatação e uma atividade antitumoral. Contudo, o presente trabalho, bem como outros dados mais recentes, sugerem que a sulfatação não seria a única característica estrutural importante nos potenciais biológicos exibidos pelos GAGs. (BRITO et. al., 2018; CAVALCANTE et. al., 2018; CHAVANTE et. al., 2014; LIMA et. al., 2013; PALHARES et. al., 2019). Cada vez mais estudos trazem a ideia de que os grupos aniônicos dos GAGs são responsáveis por não somente as funções biológicas, mas pelo seu processamento e modificação nos organismos, reforçando a hipótese de que não somente a posição e direção de grupamentos sulfato são ditadores das atividades biológicas desses compostos, mas também ácido carboxílico, aldeído e grupos funcionais nitro. Atualmente, pouco se sabe sobre o efeito de GAGs à nível molecular, mais especificamente sobre os mecanismos pelos quais seriam capazes de induzir uma modulação da expressão gênica, não somente no câncer mas em outras condições fisio-patológicas.

O amplo potencial biotecnológico apresentado por GAGs nos últimos anos, levou a bioquímica moderna à buscar novas estratégias para produção de moléculas sintéticas miméticas de GAGs, o que trouxe mais conhecimento sobre as funções e interações desses polissacarídeos. Um composto sintético, mimético de carboidratos do tipo imidazólio aldeído, o NIC (2-butyl-5-chloro3-(4-nitro-benzyl)-3H-imidazole-4-carbaldehyde), apresenta grupos funcionais em comum com o HS, como sulfato, nitro e carboxi-aldeído, o que o coloca em uma posição similar à unidade dissacarídica estrutural do HS. NIC apresentou a capacidade de se ligar aos sítios de ligação de heparina em VEGF, através da forte ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos lisina-30 e glicina-20, sugerindo que NIC seria até mesmo capaz de inibir a ligação de VEGF com a heparina. NIC exibiu ainda uma interessante atividade antitumoral em um modelo de metástase experimental (BASAPPA et. al., 2012).

Nesse contexto, modificações químicas de compostos GAG-miméticos poderiam direcionar efeitos biológicos específicos. A substituição dos anéis de ribose nessas moléculas gera uma importante classe de análogos de di-deoxirribonucleose (GI et. al., 1997) capazes de inibir a metástase em um

modelo de osteosarcoma *in vivo* (SADASHIVA et. al., 2012). A presença de grupos aniônicos nesses compostos por sua vez, são responsáveis por um efeito de mimetização de nucleosídeos naturais, conferindo uma interação direta destes com o DNA. Esses GAG-miméticos são também análogos de di-deoxirribonucleose e por isso podem sofrer fosforilação por proteínas-quinase celulares seguido de metabolização por enzimas, sendo então inseridos na cadeia em formação do DNA, nos quais são finalmente modificados como terminadores de cadeias (WAGNER, IYER, & MCINTEE, 2000). Assim, as características estruturais químicas das moléculas de GAGs, como a presença de diversos grupos aniônicos, podem sofrer modificações químicas durante a metabolização sistêmica e/ou celular levando à substituição dos seus grupos químicos funcionais, e assim conferir à esses polissacarídeos novas interações com moléculas variadas. Devido à grande heterogeneidade estrutural apresentada por esses polímeros as possibilidades são as mais variadas, inclusive a de que após sofrerem modificação por metabolização, GAGs exógenos, como o sCS poderiam se tornar moléculas estruturalmente capazes de interagir com o DNA e promover efeitos à nível de expressão gênica.

As vias pelas quais GAGs são capazes de inibir o desenvolvimento tumoral são pouco estudadas até o momento. Os dados apresentados neste estudo sugerem que o sCS é capaz de modular a progressão do tumor de melanoma e, parece atuar por diferentes mecanismos, inclusive à nível molecular, revelando uma ação antitumoral para compostos tipo GAGs nunca antes reportada. Além disso, os resultados aqui mostrados evidenciam o papel do receptor PAR-1 e sua ativação pela trombina como peças chaves no desenvolvimento do melanoma, bem como colocando o sCS como um importante agente modulador desse mecanismo. É importante destacar ainda, que apesar do seu potencial anticoagulante, o sCS apresentou um baixo efeito hemorrágico quando comparado à heparina, em um trabalho prévio (PALHARES et. al., 2019), apontando esse polissacarídeo natural como um modelo relevante no estudo da relação entre compostos tipo CS e o desenvolvimento do câncer.



CONCLUSÃO



6. CONCLUSÕES

- ✓ Com base na análise dos dados obtidos, podemos concluir que o sCS isolado de *L. vannamei*:
- ✓ É uma molécula de natureza única por apresentar o incomum resíduo GlcA 3-O-sulfato em sua estrutura.
- ✓ Não apresenta efeito citotóxico nem é capaz de induzir morte e/ou apoptose das células tumorais B16F10.
- ✓ Inibe a migração celular e a clonogenicidade das células tumorais.
- ✓ Inibe a expressão *in vitro* de genes relacionados ao desenvolvimento do melanoma em células tumorais.
- ✓ Diminui os níveis de TNF- α e melanina secretados pelas células tumorais.
- ✓ Reduz o crescimento tumoral *in vivo*.
- ✓ Modula a expressão *in vivo* de genes relacionados ao desenvolvimento do melanoma, incluindo PAR-1, em amostras de tumores e pulmões de camundongos.
- ✓ Reduz os níveis plasmáticos de citocinas VEGF *in vivo*.
- ✓ Diminui a marcação através de imuno-histoquímica de PAR-1 e VEGF em amostras de tumores e pulmões de camundongos.
- ✓ Apresenta-se como um modelo biotecnológico interessante na pesquisa por novos compostos antitumorais.



REFERÊNCIAS



7. REFERÊNCIAS

ADAMS, G.N.; ROSENFELDT, L.; FREDERICK, M.; MILLER, W.; WALTZ, D.; KOMBRINCK, K.; ET AL. Colon cancer growth and dissemination relies upon thrombin, stromal PAR-1, and fibrinogen. **Cancer Research**. 75, 4235–4243. 2015.

AL, S.S.; SHARAF, L.H.; LUQMANI, Y.A. Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). **International Journal of Oncology**. 38, 1197–1217. 2011.

ALBAN, S. Adverse effects of heparina. **Handbook of Experimental Pharmacology**. 207:211-63, 2012.

ALMEIDA, R., LEVERY, S.B., MANDEL, U., KRESSE, H., SCHWIENSTEK, T. BENNETT, E. P., CLAUSEN, H. Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylosebeta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family. **Journal of Biological Chemistry**. 274, 26165–26171. 1999.

ARORA, P.; RICKS, T.K.; TREJO, J. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. **Journal of Cell Science**. 120: 921-8, 2007.

AUSTIN, K.M.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A. Matrix metalloproteases and PAR1 activation. **Blood**. 121, 431–439. 2013.

AFRATIS, N., GIALELI, C., NIKITOVIC, D., TSEGENIDIS, T., KAROUSOU, E., THEOCHARIS, A.D., PAVÃO, M.S., TZANAKAKIS, G.N., KARAMANOS, N.K. Glycosaminoglycans: Key players in cancer cell biology and treatment. **FEBS Journal**. 279, 1177–1197. 2012.

AXELRAD, T.W., DEO, D.D., OTTINO, P., VAN KIRK, J., BAZAN, N.G., BAZAN, H.E., HUNT, J.D. Platelet-activating factor (PAF) induces activation of matrix metalloproteinase 2 activity and vascular endothelial cell invasion and migration. **Faseb Journal**. 18(3), 568–570. 2004.

BAHOU W. F. Protease-activated receptors. **Current Topics in developmental biology**. 3, 1800-14. 2003.

BAI, X., ZHOU, D., BROWN, J. R., CRAWFORD, B. E., HENNET, T., ESKO, J. D. Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6). **Journal of Biological Chemistry**. 276, 48189–48195. 2001.

BALCH, C.M.; GERSHENWALD, J.E.; SOONG, J.W.; ET AL. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. **Journal of Clinic Oncology**. 27, 6199-6206. 2009.

BARTOLOME, R.A.; GALVEZ, B.G.; LONGO, N.; BALEUX, F.; VAN MUIJEN, G.N.; SANCHEZ-MATEOS, P.; ARROYO, A.G.; TEIXIDO, J. Stromal Cell-Derived Factor-1 α Promotes Melanoma Cell Invasion across Basement Membranes Involving Stimulation of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase and Rho GTPase Activities. **Cancer Research**. 64, 2534–2543. 2004.

BASAPPA, X.; MURUGAN, S.; SUGAHARA, K.N.; LEE, C.M.; TEN DAM, G.B.; VAN KUPPEVELT, T.H.; MIYASAKA, M.; YAMADA, S.; SUGAHARA, K. Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells. **Glycobiology**. 19, 735–742. 2006.

BASS R, FERNANDEZ A M, ELLIS V. Maspin inhibits cell migration in the absence of protease inhibitory activity. **Journal of Biological Chemistry**. 277, 46845-8. 2002.

BETTSTETTER, M., WOENCKHAUS, M., WILD, P. J., RUMMELE, P., BLASZYK, H., HARTMANN, A., HOFSTADTER, F., DIETMAIER, W. Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. **Journal of Pathology**. 205, 606-14. 2005.

BHATTACHARYA, A., SCHMITZ, U., RAATZ, Y., SCHÖNHERR, M., KOTTEK, T., SCHAUER, M., FRANZ, S., SAALBACH, A., ANDEREGG, U., WOLKENHAUER, O., SCHADENDORF, D., SIMON, J.C., MAGIN, T., VERA, J., KUNZ, M. miR-638 promotes melanoma metastasis and protects melanoma cells from apoptosis and autophagy. **Oncotarget** 6, 2966–2980. 2015.

BIANCONE, L., CANTALUPPI, V., DEL SORBO, L., RUSSO, S., TJOELKER, L.W., CAMUSSI, G. Platelet-activating factor inactivation by local expression of platelet-activating factor acetyl-hydrolase modifies tumor vascularization and growth. **Clinical Cancer Research**. 9 (11), 214–4220. 2003

BOCHENEK, J., PÜSKÜLLÜOĞLU, M., KRZEMIENIECKI, K. The antineoplastic effect of low-molecular-weight heparins-A literature review. **Contemp. Oncol**. 17, 6–13. 2013.

BODE, W. Structure and interaction modes of thrombin. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. 36, 122-130. 2006.

BOIRE, A.; COVIC, L.; AGARWAL, A.; JACQUES, S.; SHERIFI, S.; KULIOPULOS, A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. **Cell**. 120: 303-13. 2005.

BORSIG, L. Heparin as an inhibitor of cancer progression. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.** 93, 335–349. 2010.

BORSIG, L., WANG, L., CAVALCANTE, M.C.M, CARDILO-REIS, L., FERREIRA, P.L., MOURAO, P.A.S., ESKO, J.D., PAVAO, M.S.G. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. **Journal of Biological Chemistry.** 98, 14984-14991. 2007.

BOUCHARABA, A., SERRE, C.M., GRES, S., SAULNIER-BLACHE, J.S., BORDET, J.C., GUGLIELMI, J., CLEZARDIN, P., PEYRUCHAUD, O. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. **The Journal of Clinical Investigation.** 114, 1714–1725. 2004.

BRITO, A.S., CAVALCANTE, R.D., CAVALHEIRO, R.P., PALHARES, L.C., NOBRE, L.T., ANDRADE, G.P., NADER, H.B., LIMA, M.A., & CHAVANTE, S.F. Anti-IIa activity and antitumor properties of a hybrid heparin/heparan sulfate-like compound from *Litopenaeus vannamei* shrimp. **International journal of biological macromolecules.** 118, 1470-1478 . 2018.

BROMBERG, M.E.; KONIGSBERG, W.H.; MADISON, J.F.; PAWASHE, A.; GAREN, A. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. **Proceedings of the National Academy of Science of USA.** 92: 8205-9. 1995.

BRONKHORST, I.H.; LY, L.V.; JORDANOVA, E.S.; VROLIJK, J.; VERSLUIS, M.; LUYTEN, G.P.; JAGER, M.J. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. **Investigative Ophthalmology & Visual Science.** 52: 643–650. 2011.

BUSSOLATI, B., BIANCONE, L., CASSONI, P., RUSSO, S., ROLAPLESZCZYNSKI, M., MONTRUCCHIO, G., CAMUSSI, G. PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. **The American Journal of Pathology.** 157(5),1713–1725. 2000.

CAMUSSI, G., MONTRUCCHIO, G., LUPIA, E., DE MARTINO, A., PERONA, L., ARESE, M., VERCELLONE, A., TONIOLO, A., BUSSOLINO, F. Platelet-activating factor directly stimulates *in vitro* migration of endothelial cells and promotes *in vivo* angiogenesis by a heparin-dependent mechanism. **Journal of Immunology.** 154(12), 6492–6501. 1995.

CARDIN, A.D.; DEMETER, D.A.; WEINTRAUB, H.J.; JACKSON, R.L. Molecular design and modelling of protein–heparin interactions. **Methods Enzymol.** 203: 556–83. 1991.

CAVALCANTE, R.S.; BRITO, A.S.; PALHARES, L.C.; ANDRADE, M.L.; CAVALHEIRO, R.P.; NADER, H.B.; SASSAKI, G.L.; CHAVANTE, S.F. 2,3-Di-O-sulfo glucuronic acid: An unmodified and unusual residue in a highly sulfated chondroitin sulfate from *Litopenaeus vannamei*. **Carbohydrate Polymers**. 183, 192–200. 2018

CHAVANTE, S.F.; BRITO, A.S.; LIMA, M.; YATES, E.; NADER, H.B.; GUERRINI, M.; TORRI, G.; BISIO, A. A heparin-like glycosaminoglycan from shrimp containing high levels of 3-O-sulfated D-glucosamine groups in an unusual trisaccharide sequence. **Carbohydrate Research**. 390, 59-66. 2014.

CHAY, C.H.; COOPER, C.R.; GENDERNALIK, J.D.; DHANASEKARAN, S.M.; CHINNAIYAN, A.M.; RUBIN, M.A.; SCHMAIER, A.H.; PIENTA, K.J. A functional thrombin receptor (PAR1) is expressed on bone-derived prostate cancer cell lines. **Urology**. 60: 760-5. 2002.

CHEN, M.B.; WHISLER, J.A.; JEON, J.S.; ET AL. Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. **Integrative Biology (Camb)**. 5,1262–71. 2013.

CHEN, Q.; BOIRE, A.; JIN, X.; VALIENTE, M.; ER, E.E.; LÓPEZ-SOTO, A.; JACOB, L.S.; PATWA, R.; SHAH, H.; XU, K. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. **Nature**. 533, 493–498. 2016.

CHIANG, A.C., MASSAGUE, J. Molecular basis of metastasis. **New England Journal of Medicine**. 359: 2814–2823. 2008.

CLARK, W.H. J.R, ELDER DE, GUERRY D, EPSTEIN MN, GREENE MH, VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**. 15, 1147–1165. 1984.

CLEMENTE, C., COCHRAN, A. J., ELDER, D. E., LEVENE, A., MACKIE, R. M., MIHM, M. C., RILKE, F. CASCINELLI, N.FITZPATRICK, T. B., SOBER, A. J. Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: Concordance among pathologists convened by the world health organization melanoma programme. **Human Pathology**. 22, 4, 313-319. 1991.

CONDEELIS, J. & POLLARD, J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**. 124, 263–266. 2006.

CONIGLIO, S.J., EUGENIN, E., DOBRENIS, K., STANLEY, E.R., WEST, B.L., SYMONS, M.H., SEGALL, J.E. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. **Molecular. Medicine**. 18, 519–527. 2012.

COTRINA, M.L.; LIN, J.H.; NEDERGAARD, M. Adhesive properties of connexin hemichannels. **Glia**. 56:1791-8, 2008.

DARMOUL, D.; GRATIO, V.; DEVAUD, H.; LEHY, T.; LABURTHE, M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. **American Journal of Pathology**. 162, 1503-13. 2003.

DATTA, D.; NATH, S.; TALAPATRA, S.N.; SWARNAKAR, S. Bioactive Compounds from Marine Invertebrates for Potential Medicines – An Overview. **International Letters of Natural Sciences**. 34, 42-61. 2015.

DE CRISTOFARO, R.; DE CANDIA, E. Thrombin domains: structure, function and interaction with platelet receptors. **Journal of Thrombosis & Thrombolysis**. 15: 151–63. 2003.

DEEPA, S.S.; UMEHARA, Y.; HIGASHIYAMA, S.; ITOH, N.E.; SUGAHARA, K. Specific Molecular Interactions of Oversulfated Chondroitin Sulfate E with Various Heparin-binding Growth Factors. **The Journal of Biological Chemistry**. 277: 43707–43716, 2002;

DEEPA, S.S.; YAMADA, S.; FUKUI, S.; SUGAHARA, K. Structural determination of novel sulfated octasaccharides isolated from chondroitin sulfate of shark cartilage and their application for characterizing monoclonal antibody epitopes. **Glycobiology**. 17, 631-45. 2007.

DENK, A. E., BETTSTETTER, M., WILD, P. J., HOEK, K., BATAILLE, F., DIETMAIER, W., BOSSERHOFF, A. K. Loss of maspin expression contributes to a more invasive potential in malignant melanoma. **Pigment Cell Research**. 20, 112-9. 2007.

DENK, A.E.; BETTSTETTER, M.; WILD, P.J.; HOEK, K.; BATAILLE, F.; DIETMAIER, W.; BOSSERHOFF, A.K. Loss of maspin expression contributes to a more invasive potential in malignant melanoma. **Pigment Cell Res**. 20: 112-9, 2007.

DIETRICH, C.P.; DE PAIVA, J.F.; MORAES, C.T.; TAKAHASHI, H.K.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliana*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 843:1-7. 1985.

DJELLAS, Y.; MANGANELLO, J.M.; ANTONAKIS, K.; LE BRETON, G.C. Identification of Galpha13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A2 receptors. **Journal of Biological Chemistry**. 274:14325–14330, 1999.

DONATO, J.L., NOGUEIRA, M.D., MARCONDES, S., ANTUNES, E., NADER, H.B., DIETRICH, C.P., DE NUCCI, G. The kinetics of chondroitin 4-sulfate release from stimulated platelets and its relation to thromboxane A2 formation

and granule secretion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 27, 2163–2167. 1994.

DONATI, M.B. & FALANGA, A. Pathogenetic mechanisms of thrombosis in malignancy. **Acta Haematology**. 106(1-2), 18-24. 2001.

DONIA, M., KJELDTSEN, J. W. & SVANE, I. M. The controversial role of TNF in melanoma. **Oncoimmunology**. 5(4), 1107699. 2015.

DREYFUSS, J. L., REGATIERI, C. V., LIMA, M. A., PAREDES-GAMERO, E. J., BRITO, A. S., CHAVANTE, S. F., BELFORT JR, R. , FARAH, M. E. and NADER, H. B. A heparin mimetic isolated from a marine shrimp suppresses neovascularization. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 8: 1828-1837. 2010.

DUSABAN, S.S.; PURCELL, N.H.; ROCKENSTEIN, E.; MASLIAH, E.; CHO, M.K.; SMRCKA, A.V.; BROWN, J.H. Phospholipase C epsilon links G protein-coupled receptor activation to inflammatory astrocytic responses. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**. 110, 3609–3614. 2013.

EBRAHIMI, S., RAHMANI, F., BEHNAM-RASSOULI, R., HOSEINKHANI, F., PARIZADEH, M. R., KERAMATI, M. R., KHAZAIE, M., AVAN, A. HASSANIAN, M. S. Proinflammatory signalling functions of thrombin in cancer. **Journal of Cell Physiology**. 232, 2323–2329. 2017.

EL-SABBAN, M. E. & PAULI, B. U. Cytoplasmic dye transfer between metastatic tumor cells and vascular endothelium. **Journal of Cellular Biology**. 115, 1375-82. 1991.

ELZARRAD, M.K.; HAROON, A.; WILLECKE, K.; DOBROWOLSKI, R.; GILLESPIE, M.N.; AL-MEHDI, A.B. Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. **BMC Medicine**. 6:20, 2008.

EVEN-RAM, S.; UZIELY, B.; COHEN, P.; GRISARU-GRANOVSKY, S.; MAOZ, M.; GINZBURG, Y.; REICH, R.; VLODAVSKY, I.; BAR-SHAVIT, R. Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. **Nature Medicine**. 4: 90914. 1998.

FALANGA, A., MARCHETTI, M. & VIGNOLI, A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 11(2), 223-33. 2013.

FALLANI, A., CALORINI, L., MANNINI, A., GABELLIERI, S., MUGNAI, G., ANDRUGGIERI, S. Platelet-activating factor (PAF) is the effector of IFN

gamma-stimulated invasiveness and motility in a B16 melanoma line. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. 81, 171–177. 2006.

FARIED, L.S.; FARIED, H.; KIMURA, M.; NAKAJIMA, M.; SOHDA, T.; MIYAZAKI, H.; KATO, N.; USMAN, H.; KUWANO. RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. **European Journal of Cancer**. 42: 1455-1465. 2006.

FEYZI, E.; SALDEEN, T.; LARSSON, E.; LINDAHL, U.; AND SALMIVIRTA, M. Age-dependent Modulation of Heparan Sulfate Structure and Function. **Journal of Biological Chemistry**. 273: 13395–13398. 1998.

FISCHER, E.G.; RUF, W.; MUELLER, B.M. Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells. **Cancer Research**. 55, 1629-32. 1995.

FLAHERTY, K.T., INFANTE, J.R., DAUD, A., GONZALEZ, R., KEFFORD, R.F., SOSMAN, J., HAMID, O., SCHUCHTER, L., CEBON, J., IBRAHIM, N., KUDCHADKAR, R., BURRIS, H.A.R. D., FALCHOOK, G., ALGAZI, A., LEWIS, K., LONG, G.V., PUZANOV, I., LEBOWITZ, P., SINGH, A., LITTLE, S., SUN, P., ALLRED, A., OUELLET, D., KIM, K.B., PATEL, K., WEBER, J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. **The New England Journal of Medicine**. 367, 1694-703. 2012.

FOSS, A.J.; ALEXANDER, R.A.; JEFFERIES, L.W.; HUNGERFORD, J.L.; HARRIS, A.L.; LIGHTMAN, S. Microvessel count predicts survival in uveal melanoma. **Cancer Research**. 56: 2900–2903. 1996.

FRANTZ, C., BARREIRO, G., DOMINGUEZ, L., CHEN, X., EDDY, R., CONDEELIS, J., KELLY, M.J., JACOBSON, M.P., BARBER, D.L. Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: Role of phosphoinositide binding. **Journal of Cellular Biology**. 183, 865–879. 2008.

FTHENOU, E., ZONG, F., ZAFIROPOULOS, A., DOBRA, K., HJERPE, A., TZANAKAKIS, G.N. Chondroitin sulfate A regulates fibrosarcoma cell adhesion, motility and migration through JNK and tyrosine kinase signaling pathways. **In Vivo**. 23, 69–76. 2009.

GERSHENWALD, J. E., SUMNER, W., CALDERONE, T., WANG, Z., HUANG, S., BAR-ELI, M. Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo. **Oncogene**. 20, 3363-75. 2001.

GERSHENWALD, J.E.; SUMNER, W.; CALDERONE, T.; WANG, Z.; HUANG, S.; BAR-ELI, M. Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo. **Oncogene**. 20, 3363-75. 2001.

- GI, H.J.; XIANG, Y.; SCHINAZI, R.F.; ZHAO, K.; Synthesis of dihydroisoxazole nucleoside and nucleotide analogs. **Journal of Organic Chemistry**. 62: 88 – 92. 1997.
- GLAZER, A.M.; WINKELMANN, R.R.; FARBERG, A.S.; RIGEL, D.S. Analysis of trends in US melanoma incidence and mortality. **JAMA Dermatology**. 153:322–325, 2017.
- GÖTTING, C., KUHN, J. & KLEESIEK, K. Human xylosyltransferases in health and disease. **Cell. Mol. Life Sci**. 64, 1498–1517. 2007.
- GREEN, J.V.; ORSBORN, K.I.; ZHANG, M.; TAN, Q.K.G.; GREIS, K.D.; POROLLO, A.; ET AL. Heparin binding motifs and biofilm formation by *Candida albicans*. **Journal of Infectious Diseases**. 208: 1695–704. 2013.
- GRIMSEY, N.; LIN, H.; TREJO, J. Endosomal signaling by protease-activated receptors. **Methods Enzymology**. 535, 389–401. 2014.
- GRIVENNIKOV, S.I., GRETEN, F.R. & KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 140, 883–899. 2010.
- GUARNERI, C.; BEVELACQUA, V.; POLESEL, J.; FALZONE, L.; CANNAVÒ, P.S.; SPANDIDOS, D.A.; MALAPONTE, G.; LIBRA, M. NF- κ B inhibition is associated with OPN/MMP-9 downregulation in cutaneous melanoma. **Oncology Reports**. 37, 737–46. 2017.
- GULLAPALLI, A.; WOLFE, B.L.; GRIFFIN, C.T.; MAGNUSON, T.; TREJO, J. An essential role for SNX1 in lysosomal sorting of protease-activated receptor-1: evidence for retromer-, Hrs-, and Tsg101-independent functions of sorting nexins. **Molecular Biology of the Cell**. 17, 1228–38. 2006.
- GUPTA, R.A. & DUBOIS, R.N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nature Reviews. Cancer**. 1 (1),11–21. 2001.
- HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. **Cell**. 86:353–364, 1996.
- HEIDER, I.; SCHULZE, B.; OSWALD, E.; HENKLEIN, P.; SCHEELE, J.; KAUFMANN, R. PAR1-type thrombin receptor stimulates migration and matrix adhesion of human colon carcinoma cells by a PKCepsilon-dependent mechanism. **Oncology Research**. 14: 475-82. 2004.
- HENRIKSON, K.P.; SALAZAR, S.L.; FENTON, J.W.; PENTECOST, B.T. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. **British Journal of Cancer**. 79, 401-6. 1999.
- HIRSH, J. Low Molecular Weight Heparin. **Thrombosis and Haemostasis**. 70(1), 204-207. 1993.

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

HORIUCHI, A.; IMAI, T. ; WANG, C. ; ET AL. Up-regulation of small GTPases, RHOA and RHOC, is associated with tumor pro-gression in ovarian carcinoma. **Laboratory Investigation**. 83: 861-870. 2003.

HORN, S., FIGL, A., RACHAKONDA, P.S., FISCHER, C., SUCKER, A., GAST, A., KADEL, S., MOLL, I., NAGORE, E., HEMMINKI, K., SCHADENDORF, D., KUMAR, R. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. **Science**. 339, 959–961. 2013.

HOROWITZ, N.A.; BLEVINS, E.A.; MILLER, W.M.; PERRY, A.R.; TALMAGE, K.E.; MULLINS, E.S.; ET AL. Thrombomodulin is a determinant of metastasis through a mechanism linked to the thrombin binding domain but not the lectin-like domain. **Blood**. 118, 2889–2895. 2011.

HU, L.; LEE, M.; CAMPBELL, W.; PEREZ-SOLER, R.; KARPATKIN, S. Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis. **Blood**. 104, 2746–2751. 2004.

HU, L.; ROTH, J.M.; BROOKS, P.; LUTY, J.; KARPATKIN, S. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis. **Cancer Research**. 68, 4666–4673. 2008.

HUANG, F.W., HODIS, E., XU, M.J., KRYUKOV, G.V., CHIN, L., GARRAWAY, L.A. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. **Science**. 339, 957–959. 2013.

HUANG, G.J.; HUANG, S.S.; DENG, J.S. Anti-inflammatory activities of inotilone from *Phellinus linteus* through the inhibition of MMP-9, NF- κ B, and MAPK activation in vitro and in vivo. **PLoS ONE**. 7: 35922. 2012.

HUANG, S., JEAN, D., LUCA, M., TAINSKY, M. A, BAR-ELI, M. Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. **The EMBO Journal**. 17, 4358-69. 1998.

HUANG, S.; JEAN, D.; LUCA, M.; TAINSKY, M.A.; BAR-ELI M. Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. **The EMBO Journal**. 17, 4358-69. 1998.

HUANG, Z.; MIAO, X.; LUAN, Y.; ZHU, L.; KONG, F.; LU, Q.; PERNOW, J.; NILSSON, G.; LI, N. PAR1-stimulated platelet releasate promotes angiogenic activities of endothelial progenitor cells more potently than PAR4-stimulated platelet releasate. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 13:465–76. 2015.

HUDAK, R.; VINCZE, J.; CSERNOCH, L.; BEKE DEBRECENI, I.; OLAH, T.; ERDODI, F.; CLEMETSON, K.J.; KAPPELMAYER, J. The Phosphatase Inhibitor Calyculin-A Impairs Clot Retraction, Platelet Activation, and Thrombin Generation. **Biomedical Research International**. 9795271, 2017.

HUNTINGTON, J.A. Molecular recognition mechanisms of thrombin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 3,1861–1872. 2005.

IIDA, J.; WILHELMSON, K.L.; NG, J.; LEE, P.; MORRISON, C.; TAM, E. Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (progelatinase A). **Biochemistry Journal**. 403: 553–563. 2007.

IM, S.Y., KO, H.M., KIM, J.W., LEE, H.K., HA, T.Y., LEE, H.B., OH, S.J., BAI, S., CHUNG, K.C., LEE, Y.B., KANG, H.S., CHUN, S.B. Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor. **Cancer Research**. 56, 2662–2665. 1996.

IM, S.Y., KO, H.M., KIM, J.W., LEE, H.K., HA, T.Y., LEE, H.B., OH, S.J., BAI, S., CHUNG, K.C., LEE, Y.B., KANG, H.S., CHUN, S.B. Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor. **Cancer Research**. 56(11), 2662–2665. 1996.

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

ISHII, S.; ET AL. Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. **The EMBO Journal**. 16: 133–142. 1997.

JEAN, D., GERSHENWALD, J. E., HUANG, S., LUCA, M., HUDSON, M. J., TAINSKY, M. A., BAR-ELI, M. Loss of AP-2 results in upregulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. **Journal of Biological Chemistry**. 273, 16501-8. 1998.

JEAN, D.; GERSHENWALD, J.E.; HUANG, S.; LUCA, M.; HUDSON, M.J.; TAINSKY, M.A.; BAR-ELI, M. Loss of AP-2 results in upregulation of

MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. **Journal of Biological Chemistry**. 273, 16501-8. 1998.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; XU, J.; WARD, E. Cancer statistics, 2010. **CA A Cancer Journal for Clinicians**. 60, 277–300. 2010.

JENKINS, M.H.; BRINCKERHOFF, C.E.; MULLINS, D.W. CXCR3 signaling in BRAFWT melanoma increases IL-8 expression and tumorigenicity. **PLoS One**. 10, 2015.

JOHAN, M. Z. & SAMUEL, M. S. Rho–ROCK signaling regulates tumor-microenvironment interactions. **Biochemical Society Transactions**. 47(1)101-108. 2017.

JUNGE, C.E.; LEE, C.J.; HUBBARD, K.B.; ZHANG, Z.; OLSON, J.J.; HEPLER, J.R.; ET AL. Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. **Experimental Neurology**. 188:94–103, 2004.

JERONIMO, S. M. B., DIETRICH C. P., NADER, H. B. structure of sulfated glycosaminoglycans synthesized during the ontogeny of the mollusc *Pomacea* sp. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 93B, 4, 899-903, 1989.

KALANTZI, K.I.; TSOUMANI, M.E.; GOUDEVENOS, I.A.; TSELEPIS, A.D. Pharmacodynamic properties of antiplatelet agents: current knowledge and future perspectives. **Expert Reviews in Clinical Pharmacology**. 5, 319–36. 2012.

KAUSHAL, V.; KOHLI, M.; DENNIS, R.A.; SIEGEL, E.R.; CHILES, W.W.; MUKUNYADZI, P. Thrombin receptor expression is upregulated in prostate cancer. **Prostate**. 66: 273-82. 2006.

KAWASHIMA, H.; ATARASHI, K.; HIROSE, M.; HIROSE, J.; YAMADA, S.; SUGAHARA, K.; MIYASAKA, M. Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAb1IdoAa1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. **Journal of Biological Chemistry**. 277: 12921–12930. 2002.

KIM, H.A., SEO, K.H. & KANG, Y.R., KO, H.M., KIM, K.J., BACK, H.K., LEE, H.K., IM, S.Y. Mechanisms of platelet-activating factor-induced enhancement of VEGF expression. **Cellular physiology and biochemistry**. 27 (1), 55-62. 2011.

KIURU, P.; D'AURIA, M.V.; MULLER, C.D.; TAMMELA, P.; VUORELA, H.; YLI-KAUHALUOMA, J. Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds. **Planta Medica**. 80,1234-46. 2014.

KLEER, C.G.; GRIFFITH, K.A.; SABEL, M.S.; ET AL. RHOC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast. **Breast Cancer Research Treatment**. 93, 101-110. 2005.

KLEER, C.G.; VAN GOLEN, K.L.; ZHANG, Y.; WU, Z.F.; RUBIN, M.A.; MERAJVER S.D. Characterization of RHOC expression in benign and malignant breast disease—a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. **American Journal of Pathology**. 160: 579-584, 2002.

KOLAT, D., KALUZINSKA, Z., BEDNAREK, A. K., PLUCIENNIK, E. The biological characteristics of transcription factors AP-2 α and AP-2 γ and their importance in various types of cancers. **Bioscience Reports**. 39, BSR20181928. 2019.

KÖWITSCH, A.; ZHOU, G.; GROTH, T. Medical application of glycosaminoglycans: a review. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. 12, 23– 41. 2018.

KRANTZ, M.J.; KAUL, S. Secondary prevention of cardiovascular disease with vorapaxar: a new era of 3-drug antiplatelet therapy? **JAMA International Medicine**. 1, 9–10. 2015.

KREUGER, J.; PRYDZ, K.; PETTERSSON, R.F.; LINDAHL, U.; AND SALMIVIRTA, M. Characterization of fibroblast growth factor 1 binding heparan sulfate domain. **Glycobiology**. 9: 723–729. 1999.

KROCK, B.L.; SKULI, N.; SIMON, M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. **Genes Cancer**. 2:1117–1133, 2011.

LARKIN, J., ASCIERTO, P.A., DRÉNO, B., ATKINSON, V., LISZKAY, G., MAIO, M., MANDALÀ, M., DEMIDOV, L., STROYAKOVSKIY, D., THOMAS, L., DE LA CRUZ-MERINO, L., DUTRIAUX, C., GARBE, C., SOVAK, M.A., CHANG, I., CHOONG, N., HACK, S.P., MCARTHUR, G.A., RIBAS, A. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. **The New England Journal of Medicine**. 371, 1867-76. 2014.

LEBREC, H.; PONCE, R.; PRESTON, B.D.; ILES, J.; BORN, T.L.; HOOPER, M. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk. **Current Medical Research and Opinion**. 31, 557–74. 2015.

LECHTENBERG, B. C., JOHNSON, D. J. D., FREUND, S. M. V., HUNTINGTON, J. A. NMR resonance assignments of thrombin reveal the conformational and dynamic effects of ligation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 107 (32), 14087-14092. 2010.

LEE, J.T., HERLYN, M. Microenvironmental influences in melanoma progression. **Journal of Cellular Biochemistry**. 101(4), 862–872. 2006.

LEONARD, A.; MARANDO, C.; RAHMAN, A.; FAZAL, F. Thrombin selectively engages LIM kinase 1 and slingshot-1L phosphatase to regulate NF- κ B activation and endothelial cell inflammation. **American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology**. 305, 651–664. 2013.

LI, F., BAYKAL, D., HORAIST. C., YAN, C. N., CARR, B. N., RAO, G. N., RUNGE, M. S. Cloning and identification of regulatory sequences of the human thrombin receptor gene. **Journal of Biological Chemistry**. 271, 26320-8. 1996.

LI, F.; TEN DAM, G.B.; MURUGAN, S.; YAMADA, S.; HASHIGUCHI, T.; MIZUMOTO, S.; OGURI, K.; OKAYAMA, M.; VAN KUPPEVELT, T.H.; SUGAHARA, K. Involvement of highly sulfated chondroitin sulfate in the metastasis of the Lewis lung carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**. 283, 34294–34304. 2008.

LI, J.J.; ET AL. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. **Thrombosis and Haemostasis**. 85, 204–206. 2001.

LI, S.M.; JIANG, P.; XIANG, Y.; WANG, W.W.; ZHU, Y.C.; FENG, W.Y.; ET AL. Protease-activated receptor (PAR)1, PAR2 and PAR4 expressions in esophageal squamous cell carcinoma. **Dongwuxue Yanjiu**. 35, 420–425. 2015.

LIMA, M.A.; HUGHES, A.J.; VERALDI, N.; RUDD, T.R.; HUSSAIN, R.; BRITO, A.S.; CHAVANTE, S.F.; TERSARIOL, I.I.; SILIGARDI, G.; NADER, H.B.; YATES, E.A. Antithrombin stabilisation by sulfated carbohydrates correlates with anticoagulant activity. **MedChemComm**. 4, 870. 2013.

LIN, Q.; BALASUBRAMANIAN, K.; FAN, D.; KIM, S.J.; GUO, L.; WANG, H.; BAR-ELI, M.; ALDAPE, K.D.; FIDLER, I.J. Reactive astrocytes protect melanoma cells from chemotherapy by sequestering intracellular calcium through gap junction communication channels. **Neoplasia**. 12, 748–754. 2010.

LIU, L.; YAN, B.; YANG, Z.; ZHANG, X.; GU, Q.; YUE, X. ncRuPAR inhibits gastric cancer progression by down-regulating protease-activated receptor-1. **Tumour Biology**. 35, 7821–9. 2014.

LIU, X.; LIU, Y.; HAO, J.; ZHAO, X.; LANG, Y.; FAN, F.; CAI, C.; LI, G.; ZHANG, L.; YU, G. In Vivo Anti-Cancer Mechanism of Low-Molecular-Weight Fucosylated Chondroitin Sulfate (LFCS) from Sea Cucumber *Cucumaria frondosa*. **Molecules**. 21, 625. 2016.

LOGGINI, B., RINALDI, I., PINGITORE, R., CRISTOFANI, R., CASTAGNA, M., BARACHINI, P. Immunohistochemical study of 49 cutaneous melanomas: p53, PCNA, Bcl-2 expression and multidrug resistance. **Tumori**. 87, 179-86. 2001.

LOKWANI, R.; NINA AZMI, N.S.B.; YUSOFF, M.B.M.; ICHWAN, S.J.A. Beyond Anticoagulant: Heparin as a Potential Anti-cancer Agent. **JOBIMB**, Vol 2, No 2, 37-43, 2014.

LONG, G.V., STROYAKOVSKIY, D., GOGAS, H., LEVCHENKO, E., DE BRAUD, F., LARKIN, J., GARBE, C., JOUARY, T., HAUSCHILD, A., GROB, J.J., CHIARION, SILENI, V., LEBBE, C., MANDALÀ, M., MILLWARD, M., ARANCE, A., BONDARENKO, I., HAANEN, J.B., HANSSON, J., UTIKAL, J., FERRARESI, V., KOVALENKO, N., MOHR, P., PROBACHAI, V., SCHADENDORF, D., NATHAN, P., ROBERT, C., RIBAS, A., DEMARINI, D.J., IRANI, J.G., CASEY, M., OUELLET, D., MARTIN, A.M., LE, N., PATEL, K., FLAHERTY, K. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. **The New England Journal of Medicine**. 371, 1877-88. 2014.

LU, X.; KANG, Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of **Clinical Cancer Research**. 16:5928–5935. 2010.

MAKITIE, T.; SUMMANEN, P.; TARKKANEN, A.; KIVELA, T. Microvascular density in predicting survival of patients with choroidal and ciliary body melanoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 40, 2471–2480. 1999.

MALMSTRÖM, A., BARTOLINI, B., THELIN, M. A., PACHECO, B., MACCARANA, M. Iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate: biosynthesis and biological function. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 60, 916–925. 2012.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**. 454: 436–444. 2008.

MARATHE, G.K., JOHNSON, C., BILLINGS, S.D., SOUTHALL, M.D., PEI, Y., SPANDAU, D., MURPHY, R.C., ZIMMERMAN, G.A., MCINTYRE, T.M., TRAVERS, J.B. Ultraviolet B radiation generates platelet activating factor-like phospholipids underlying cutaneous damage. **Journal of Biological Chemistry**. 280(42), 35448–35457. 2005.

MARATHE, G.K.; JOHNSON, C.; BILLINGS, S.D.; SOUTHALL, M.D.; PEI, Y.; SPANDAU, D.; MURPHY, R.C.; ZIMMERMAN, G.A.; MCINTYRE, T.M.; TRAVERS, J.B. Ultraviolet B radiation generates platelet-activating factor-like

phospholipids underlying cutaneous damage. **Journal Biology Chemistry**. 280, 35448–35457. 2005.

MARCONI, A.; BORRONI, R.G.; TRUZZI, F.; LONGO, C.; PISTONI, F.; PELLACANI, G.; PINCELLI, C. Hypoxia-Inducible Factor-1a and CD271 inversely correlate with melanoma invasiveness. **Experimental Dermatology**. 24:381–400, 2015.

MARTÍNEZ-GARCÍA, M.A.; ET AL. A prospective multicenter cohort study of cutaneous melanoma: clinical staging and potential associations with HIF-1 α and VEGF expressions. **Melanoma Research**. 27:558–564. 2017.

MARTINOLI, C.; GANDINI S.; LUISE, C.; MAZZAROL, G.; CONFALONIERI, S.; PELICCI, G.P.; TESTORI, A.; FERRUCCI, P.F. Maspin expression and melanoma progression: a matter of sub-cellular localization. **Modern Pathology**. 27, 412-9, 2014.

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A.C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**. 298, 529. 2016.

MASSI, D.; NALDINI, A.; ARDINGHI, C.; CARRARO, F.; FRANCHI, A; PAGLIERANI, M; ET AL. Expression of protease-activated receptors 1 and 2 in melanocytic nevi and malignant melanoma. **Human Pathology**. 36, 676–85. 2005.

MCGOWEN, R.; BILIRAN, H.J.R.; SAGER, R.; SHENG, S. The surface of prostate carcinoma DU145 cells mediates the inhibition of urokinase-type plasminogen activator by maspin. **Cancer research**. 60, 4771-8, 2000.

MELNIKOVA VO, BALASUBRAMANIAN K, VILLARES GJ, DOBROFF AS, ZIGLER M, WANG H, ET AL. Crosstalk between protease-activated receptor 1 and platelet-activating factor receptor regulates melanoma cell adhesion molecule (MCAM/MUC18) expression and melanoma metastasis. **Journal of Biological Chemistry** 284:28845–55. 2009.

MELNIKOVA, V.O.; BALASUBRAMANIAN, K.; VILLARES, G.J.; DOBROFF, A.S.; ZIGLER, M.; WANG, H. ET AL. Crosstalk between protease-activated receptor 1 and platelet-activating factor receptor regulates melanoma cell adhesion molecule (MCAM/MUC18) expression and melanoma metastasis. **Journal of Biological Chemistry**. 284, 28845–55. 2009.

MENTER, D.G.; TUCKER, S.C.; KOPETZ, S.; SOOD, A.K.; CRISSMAN, J.D.; HONN, K.V. Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited. **Cancer Metastasis Reviews**. 33, 231–269. 2014.

MESNIL, M.; CRESPIAN, S.; AVANZO, J.L.; ZAIDANDAGLI, M.L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**. 1719, 125–145. 2005.

MISSIRLIS, D.; HARASZTI, T.; KESSLER, H.; SPATZ, J.P. Fibronectin promotes directional persistence in fibroblast migration through interactions with both its cell-binding and heparin-binding domains. **Scientific Reports**. 7, 3711. 2017.

MOERS, A.; NIESWANDT, B.; MASSBERG, S.; WETTSCHURECK, N.; GRÜNER, S.; KONRAD, I.; SCHULTE, V.; AKTAS, B.; GRATACAP, M.P.; SIMON, M.I. ET AL. G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. **Nature Medicine**. 9, 1418–1422. 2003.

MONZAVI-KARBASSI, B., STANLEY, J.S., HENNINGS, L., JOUSHEGHANY, F., ARTAUD, C. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans as major P-selectin ligands on metastatic breast cancer cell lines. **International Journal of Cancer**. 120, 1179-1191. 2007.

MORETTI, S.; PINZI, C.; SPALLANZANI, A.; BERTI, E.; CHIARUGI, A.; MAZZOLI, S.; FABIANI, M.; VALLECCHI, C.; HERLYN, M. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. **International Journal of Cancer**. 84: 160–168. 1999.

MOURÃO, P.A., BOISSON-VIDAL, C., TAPON-BRETAUDIÈRE, J., DROUET, B., BROS, A., FISCHER, A. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **Thrombosis Research**. 102(2):167-76. 2001.

MUELLER, B.M.; REISFELD, R.A.; EDGINGTON, T.S.; RUF, W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**. 89, 11832-6. 1992.

MURRAY, P.J., ALLEN, J.E., BISWAS, S.K., FISHER, E.A., GILROY, D.W., GOERDT, S., GORDON, S., HAMILTON, J.A., IVASHKIV, L.B., LAWRENCE, T., LOCATI, M., MANTOVANI, A., MARTINEZ, F.O., MEGE, J.L., MOSSER, D.M., NATOLI, G., SAEIJ, J.P., SCHULTZE, J.L., SHIREY, K.A., SICA, A., SUTTLES, J., UDALOVA, I., VAN GINDERACHTER, J.A., VOGEL, S.N., WYNN, T.A. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**. 41, 14–20. 2014.

NADER, H.B.; FERREIRA, T.M.; PAIVA, J.F.; MEDEIROS, M.G.; JERONIMO, S.M.; PAIVA, V.M.; DIETRICH, C.P. Isolation and structural studies of heparan

sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs. **Journal of Biological Chemistry**. 259, 1431-1435. 1984.

NAKAMURA, M., HONDA, Z., IZUMI, T., SAKANAKA, C., MUTOH, H., MINAMI, M., BITO, H., SEYAMA, Y., MATSUMOTO, T., NOMA, M. Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. **Journal of Biological Chemistry**. 266(30), 20400–20405. 1991.

NANDINI, C. D.; SUGAHARA, K. Role of the Sulfation Pattern of Chondroitin Sulfate in its Biological Activities and in the Binding of Growth Factors. **Advances in Pharmacology**. 53, 253-279. 2006.

NIEMAN, M.T.; LARUSCH, G.; FANG, C.; ZHOU, Y.; SCHMAIER, A.H. Oral thrombostatin FM19 inhibits prostate cancer. **Thrombosis and Haemostasis**. 104, 1044–1048. 2010.

NIERODZIK M.L.; CHEN, K.; TAKESHITA, K.; LI, J.J.; HUANG, Y.Q.; FENG, X.S.; ET AL. Protease-activated receptor1(PAR-1) is required and rate-limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis. **Blood**. 92:3694–700, 1998.

NIERODZIK, M.L. & KARPATKIN, S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: evidence for a thrombinregulated dormant tumor phenotype. **Cancer Cell**. 10, 355–362. 2006.

NIERS, T.M.; KLERK, C.P.; DINISIO, M.; VAN NOORDEN, C.J.; BÜLLER, H.R.; REITSMA, P.H.; RICHEL, D.J. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 61: 195–207, 2007.

NIESWANDT, B.; ET AL. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. **Cancer Research**. 59, 1295– 1300. 1999.

O'BRIEN, P.J.; MOLINO, M.; KAHN, M.; BRASS, L.F. Protease activated receptors: theme and variations. **Oncogene**. 20, 1570-81. 2001.

PALHARES, L.C.G.F. BRITO, A. S., de LIMA, M. A., NADER, H. B. LONDON, J. A., BARSUKOV, I. L., ANDRADE, G. P. V., YATES, E. A. and CHAVANTE, S. F. A further unique chondroitin sulfate from the shrimp *Litopenaeus vannamei* with antithrombin activity that modulates acute inflammation. **Carbohydrate Polymers**. 222, 115031. 2019.

PATRIE, K. M.; BOTELHO, M.J.; FRANKLIN, K.; AND CHIU, I.M. Site-directed mutagenesis and molecular modeling identify a crucial amino acid in specifying the heparin affinity of FGF-1. **Biochemistry**. 38, 9264–9272. 1999.

PAVÃO, M.S.G.; VILELA-SILVA, A.C.; MOURÃO, P.A.S. Biosynthesis of Chondroitin Sulfate: From the Early, Precursor Discoveries to Nowadays, Genetics Approaches. **Advances in Pharmacology**. 53, 117-140. 2006.

PENNA, E., ORSO, F., CIMINO, D., TENAGLIA, E., LEMBO, A., QUAGLINO, E., POLISENO, L., HAIMOVIC, A., OSELLA-ABATE, S., DE PITTÀ, C., PINATEL, E., STADLER, M.B., PROVERO, P., BERNENGO, M.G., OSMAN, I., TAVERNA, D. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. **The EMBO Journal**. 30, 1990–2007. 2011.

PIPERNO-NEUMANN, S.; DIALLO, A.; ETIENNE-GRIMALDI, M.C.; BIDARD, F.C.; RODRIGUES, M.; PLANCHER, C.; MARIANI, P.; CASSOUX, N.; DECAUDIN, D.; ASSELAIN, B.; ET AL. Phase II Trial of Bevacizumab in Combination with Temozolomide as First-Line Treatment in Patients with Metastatic Uveal Melanoma. **Oncologist**. 21: 281–282. 2016.

QIAN, B.Z. & POLLARD, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell** 141, 39–51. 2010.

QUEIROZ, K.C.; SHI, K.; DUITMAN, J.; ABERSON, H.L.; WILMINK, J.W.; VAN NOESEL, C.J.; ET AL. Protease-activated receptor-1 drives pancreatic cancer progression and chemoresistance. **International Journal of Cancer**. 135, 2294–2304. 2014.

RADHI, J. M. Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, and Bcl-2: expression in benign versus malignant components. **Journal of cutaneous medicine and surgery**. 3, 293-7. 1999.

RATH, N.; OLSON, M.F. Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. **EMBO Reports**. 13, 900–8. 2012.

RASMUSSEN, U.B., VOURET-CRAVIARI, V., JALLAT, S., SCHLESINGER, Y, PAGÈS, G., PAVIRANI, A., LECOCQ, J.P., POUYSSÉGUR, J., VAN OBBERGHEN-SCHILLING, E. cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. **FEBS Letters**. 288, 123–8. 1991.

RATNOFF, O.D.; FORBES, C.D. The evolution of knowledge about hemostasis. Disorders of Hemostasis. **Philadelphia: WB Saunders Company**. Third Edition, 1996.

REDDY, K.B.; NABHA, S.M.; ATANASKOVA, N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. **Cancer Metastasis Reviews**. 22: 395–403. 2003.

RETSAS, S.; HENRY, K.; MOHAMMED, M.Q.; MAC-RAE, K. Prognostic factors of cutaneous melanoma and a new staging system proposed by the American Joint Committee on Cancer (AJCC): validation in a cohort of 1284 patients. **European Journal of Cancer**. 38, 511–516. 2002.

RICHMOND, A. & YANG, J. The role of NF- κ B in modulating antitumor immunity. **Oncoimmunology** 5:1, e1005522. 2016.

RICHMOND, A.; YANG, J.; SU, Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**. 22, 175–86, 2009.

RICHMOND, A.; YANG, J.; SU, Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Research**. 22: 175–186. 2009.

ROBERT, C., KARASZEWSKA, B., SCHACHTER, J., RUTKOWSKI, P., MACKIEWICZ, A., STROIAKOVSKI, D., LICHINITSER, M., DUMMER, R., GRANGE, F., MORTIER, L., CHIARION-SILENI, V., DRUCIS, K., KRAJSOVA, I., HAUSCHILD, A., LORIGAN, P., WOLTER, P., LONG, G. V., FLAHERTY, K., NATHAN, P., RIBAS, A., MARTIN, A., SUN, P., CRIST, W., LEGOS, J., RUBIN, S. D., LITTLE, S. M., SCHADENDORF, D. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. **The New England Journal of Medicine**. 372, 30-9. 2015.

ROBLEDO, M.M.; BARTOLOME, R.A.; LONGO, N.; RODRIGUEZ-FRADE, J.M.; MELLADO, M.; LONGO, I.; VAN MUIJEN, G.N.; SANCHEZ-MATEOS, P.; TEIXIDO, J. Expression of Functional Chemokine Receptors CXCR3 and CXCR4 on Human Melanoma Cells. **J. Biol. Chem**. 276: 45098–45105, 2001.

ROHWER, N.; CRAMER, T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. **Drug Resistance Updates**. 14(3):191-201. 2011.

ROSSI, S.; CORDELLA, M.; TABOLACCI, C.; NASSA, G.; D'ARCANGELO, D.; SENATORE, C.; PAGNOTTO, P.; MAGLIOZZI, R.; SALVATI, A.; WEISZ, A.; FACCHIANO, A.; FACCHIANO, F. TNF-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressiveness. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. 37, 326. 2018.

- RUF, W. & MUELLER, B.M. Thrombin generation and the pathogenesis of cancer. **Seminars in thrombosis and hemostasis**. 32(1), 61–68. 2006.
- RUSSELL, R.; BRAEUER, I.; WATSON, R.; WU, C.J.; AARON, K.; MOBLEY, KAMIYA, T.; SHOSHAN, E.; BAR-ELI, M. Why is melanoma so metastatic? **Pigment Cell Melanoma Research**. 27, 19–36, 2013.
- SADASHIVA, M.P.; BASAPPA, N.S.; LI, F.; MANU, K.A.; SENGOTTUVELAN, M.; PRASANNA, D.S.; ANILKUMAR, N.C.; SETHI, G.; SUGAHARA, K.; RANGAPPA, K.S. Anti-cancer activity of novel dibenzo [b, f] azepine tethered isoxazoline derivatives. **BMC Chemical Biology**. 12:5. 2012.
- SALVEN, P., HEIKKILA, P. & JOENSUU, H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. **British Journal of Cancer**. 76, 930–934. 1997.
- SAMPAIO, L.O.; TERSARIOL, I.L.S.; LOPES, C.C.; BOUÇAS, R.I.; NASCIMENTO, F.D.; ROCHA, H.A.O.; NADER, H.B. Heparins and heparan sulfates. Structure, distribution and protein interactions. **Insights into Carbohydrate Structure and Biological Function**. 1,1-85. 2006.
- SARRABAYROUSE, G. ; PICH, C. ; MORIEZ, R. ; ARMAND-LABIT, V. ; ROCHAIX, P. ; FAVRE, G. ; ET AL. Melanoma cells treated with GGT1 and IFN-gamma allow murine vaccination and enhance cytotoxic response against human melanoma cells. **PLoS ONE** 5. 2010.
- SARRABAYROUSE, G.; SYNAEVE, C.; LEVEQUE, K.; FAVRE, G.; AND TILKIN-MARIAME, A.F. Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells. **Neoplasia**. 9: 1078–1090. 2007.
- SATO, S., KUME, K., ITO, C., ISHII, S., SHIMIZU, T. Accelerated proliferation of epidermal keratinocytes by the transgenic expression of the platelet activating factor receptor. **Archives of Dermatological Research**. 291(11), 614–621. 1991
- SATO, S.; ET AL. Accelerated proliferation of epidermal keratinocytes by the transgenic expression of the platelet activating factor receptor. **Archives in Dermatology Research**. 291, 614–621, 1999.
- SATPATHY, M.; SHAO, M.; EMERSON, R.; DONNER, D.B.; MATEI, D. Tissue transglutaminase regulates matrix metalloproteinase-2 in ovarian cancer by modulating cAMP-response element-binding protein activity. **Journal of Biological Chemistry**. 284, 15390-9. 2009.

SEDDA, S.; MARAFINI, I.; CARUSO, R.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. Proteinase activated-receptors-associated signaling in the control of gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**. 20, 11977–11984. 2014.

SEGAIN, J., BLÉTIÈRE, D. R., SAUZEAU, V., BOURREILLE, A., HILARET, G., CARIO-TOUMANIANTZ C, PACAUD P, GALMICHE JP, LOIRAND G. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor $\kappa\beta$ inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. **Gastroenterology**. 124 (5), 1180–1187. 2003.

SEO, K.H.; KO, H.M.; CHOI, J.H.; JUNG, H.H.; CHUN, Y.H.; CHOI, I.W.; LEE, H.K.; AND IM, S.Y. Essential role for platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation in macrophage-derived angiogenesis. **European Journal of Immunology**. 34: 2129–2137. 2004.

SHAIN, A.H.; BASTIAN, B.C. The genetic evolution of melanoma. **The New England Journal of Medicine**. 374, 995–996. 2016.

SHAY, J.E.; IMTIYAZ, H.Z.; SIVANAND, S.; DURHAM, A.C.; SKULI, N.; HSU, S.; ET AL. Inhibition of hypoxia-inducible factors limits tumor progression in a mouse model of colorectal cancer. **Carcinogenesis**. 35:1067–1077, 2014.

SHETTY, A.K.; KOBAYASHI, T.; MIZUMOTO, S.; NARUMI, M.; KUDO, Y.; YAMADA, S. Isolation and characterization of a novel chondroitin sulfate from squid liver integument rich in N-acetylgalactosamine(4,6-disulfate) and glucuronate(3-sulfate) residues. **Carbohydrate Research**. 344:1526-1532, 2009.

SHI, H., HUGO, W., KONG, X., HONG, A., KOYA, R.C., MORICEAU, G., CHODON, T., GUO, R., JOHNSON, D.B., DAHLMAN, K.B., KELLEY, M.C., KEFFORD, R.F., CHMIELOWSKI, B., GLASPY, J.A., SOSMAN, J.A., VAN BAREN, N, LONG, G.V., RIBAS, A., LO, R.S. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. **Cancer Discovery**. 4, 80-93. 2014.

SHIPP, E.L; HSIEH-WILSON, L.C. Profiling the sulfatation specificities of glycosaminoglycans interactions with growth factors and chemotactic proteins using microarrays. **Chemistry & Biology**. 14: 195–208, 2007.

SIEHLER, S.; WANG, Y.; FAN, X.; WINDH, R.T.; MANNING, D.R. Sphingosine 1-phosphate activates nuclear factor-kappa B through Edg receptors. Activation through Edg-3 and Edg-5, but not Edg-1, in human embryonic kidney 293 cells. **Journal of Biological Chemistry**. 276, 48733–48739. 2001.

SILINI, A.; GHILARDI, C.; ARDINGHI, C.; BERNASCONI, S.; OLIVA, P.; CARRARO, F.; NALDINI, A.; BANI, M.R.; GIAVAZZI, R. Protease-activated

receptor-1 (PAR-1) promotes the motility of human melanomas and is associated to their metastatic phenotype. **Clinical & Experimental Metastasis**. 27, 43–53. 2010.

SIN, W.C.; CRESPI, S.; MESNIL, M. Opposing roles of connexin43 in glioma progression. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**. 1818, 2058–2067. 2012.

SIRNES, S.; BRUUN, J.; KOLBERG, M.; KJENSETH, A.; LIND, G.E.; SVINDLAND, A.; BRECH, A.; NESBAKKEN, A.; LOTHE, R.A.; LEITHE, E. Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. **International Journal of Cancer**. 131, 570–581. 2012.

SLOMINSKI, A.; KIM, T.K.; BROZYNA, A.A.; JANJETOVIC, Z.; BROOKS, D.L.P.; SCHWAB, L.P.; SKOBOWIAT, C.; JÓZ'WICKI, W.; SEAGROVES, T.N. The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: Melanogenesis leads to stimulation of HIF-1 α expression and HIF-dependent attendant pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 563, 79–93. 2014.

SLOMINSKI, A.; PAUS, R.; MIHM, M.C. Inhibition of melanogenesis as an adjuvant strategy in the treatment of melanotic melanomas: selective review and hypothesis. **Anticancer Research**. 18(5B), 3709-15. 1998.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D.J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiology Review**. 84, 1155–1228. 2004.

SLOMINSKI, A.; ZBYTEK, B.; SLOMINSKI, R. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. **International Journal of Cancer**. 124, 1470–1477. 2009.

SLOMINSKI, A.; ZMIJEWSKI, M.A.; PAWELEK, J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. **Pigment Cell Melanoma Research**. 25, 14–27. 2012.

SOBEL, M.; SOLER, D.F.; KERMODE, J.C.; HARRIS, R.B. Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. **Journal of Biology Chemistry**. 267: 8857–62. 1992.

SOH, U.J.; DORES, M.R.; CHEN, B.; TREJO, J. Signal transduction by protease-activated receptors. **British Journal of Pharmacology**. 160:191–203. 2010.

SOLIT, D.B. & ROSEN, N. Resistance to BRAF inhibition in melanomas. **The New England Journal of Medicine**. 364, 772-4. 2011.

SOMLYO, A.P. & SOMLYO, A.V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiology Review**. 83(4), 1325-58. 2003.

STOCK, C. & SCHWAB, A. Protons make tumor cells move like clockwork. **Pflugers Archiv: European Journal of physiology**. 458, 1069–1083. 2009.

STOCK, C.; JUNGMANN, O.; SEIDLER, D.G. Decorin and Chondroitin-6 Sulfate Inhibit B16V Melanoma Cell Migration and Invasion by Cellular Acidification. **Journal of Cellular Physiology**. 226, 2641–2650. 2011.

SUGAHARA, K., TANAKA, Y., YAMADA, S., SENO, N., KITAGAWA, H., HASLAM, S. M. Novel sulfated oligosaccharides containing 3-O-sulfated glucuronic acid from king crab cartilage chondroitin sulfate K. Unexpected degradation by chondroitinase ABC. **The Journal of Biological Chemistry**, 271(43), 26745–26754. 1996.

SUGAHARA, K & KITAGAWA, H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. **Current Opinion in Structural Biology**. 10, 518–527. 2000.

SUGAHARA, K.; THIMMAIAH, K.N.; BID, H.K.; HOUGHTON, P.J.; RANGAPPA, K.S.; Anti-tumor activity of a novel HS-mimetic-vascular endothelial growth factor binding small molecule. **PLoS ONE**. 7: 39444. 2012.

SUWA, H.; OHSHIO, G.; IMAMURA, T.; ET AL. Overexpression of the RHOC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. **British Journal of Cancer**. 77: 147-152, 1998.

TATOUR, M.; SHAPIRA, M.; AXELMAN, E.; GHANEM, S.; KERENPOLITANSKY, A.; BONSTEIN, L.; BRENNER, B.; NADIR, Y. Thrombin is a selective inducer of heparanase release from platelets and granulocytes via protease-activated receptor-1. **Thrombosis Haemostasis**. 117, 1391–401. 2017.

TELLEZ, C.; BAR-ELI, M. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. **Oncogene**. 22: 3130-7. 2003.

TELLEZ, C.; MCCARTY, M.; RUIZ, M.; BAR-ELI, M. Loss of activator protein alpha-2 results in overexpression of protease activator receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. **Journal of Biological Chemical** . 278, 46631-42. 2003.

TILKIN-MARIAME, A.F.; CORMARY, C.; FERRO, N.; SARRABAYROUSE, G.; LAJOIE-MAZENC, I.; FAYE, J.C.; ET AL. Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. **FASEB J**. 19 : 1513–1515. 2005.

TORISU, H.; ONO, M.; KIRYU, H.; FURUE, M.; OHMOTO, Y.; NAKAYAMA, J.; NISHIOKA, Y.; SONE, S.; KUWANO, M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. **International Journal of Cancer**. 85, 182–188. 2000.

TRINDADE, E.S.; BOUÇAS, R.I.; ROCHA, H.A.; DOMINATO, J.A.; PAREDES-GAMERO, E.J.; FRANCO, C.R.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Internalization and degradation of heparin is not required for stimulus of heparan sulfate proteoglycan synthesis. **Journal of Cellular Physiology**. 2:360-6. 2008.

TRIVEDI, V.; BOIRE, A.; TCHERNYCHEV, B.; KANEIDER, N.C.; LEGER, A.J.; O'CALLAGHAN, K.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. **Cell**. 137, 332–43, 2009.

TSOPANOGLOU, N.E.; MARAGOUDAKIS, M.E. Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes. **European Cytokine Network**. 20:171–179, 2009.

TUCKER, M.A., HALPERN, A., HOLLY, E.A., HARTGE, P., ELDER DE, SAGEBIEL, R.W., GUERRY, D. 4TH, CLARK, W.H. Jr. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. **JAMA**.14, 277(18):1439-44. 1997.

UEOKA, C.; KANEDA, N.; OKAZAKI, I.; NADANAKA, S.; MURAMATSU, T.; SUGAHARA, K. Neuronal Cell Adhesion, Mediated by the Heparin-binding Neuroregulatory Factor Midkine, Is Specifically Inhibited by Chondroitin Sulfate E. Structural and functional implications of the over-sulfated chondroitin sulfate. **Journal of Biological Chemistry**. 1, 275(48), 37407-13. 2000.

UGUREL, S. RAPPL, G., TILGEN, W. & REINHOLD, U. Increased Serum Concentration of Angiogenic Factors in Malignant Melanoma Patients Correlates With Tumor Progression and Survival. **Journal of Clinical Oncology**. 19, 2, 577-583. 2001.

ULLRICH, S.E. Mechanisms underlying UV-induced immune suppression. **Mutation Research**. 571: 185–205. 2005.

USTYUZHANINA, N.E.; BILAN, M.I.; PANINA, E.G.; SANAMYAN, N.P.; DMITRENOK, A.S.; TSVETKOVA, E.A.; ET. AL. Structure and Anti-Inflammatory Activity of a New Unusual Fucosylated Chondroitin Sulfate from *Cucumaria djakonovi*. **Marine Drugs**. 16:389, 2018.

UYAMA, T., KITAGAWA, H. & SUGAHARA, K. Biosynthesis of glycosaminoglycans and Proteoglycans. in: J.P. Kamerling (Ed.), *Comprehensive Glycoscience*, vol. 3, **Elsevier**, Amsterdam. pp. 79–104. 2007.

VAN ALLEN, E.M., WAGLE, N., SUCKER, A., TREACY, D.J., JOHANNESSEN, C.M., GOETZ, E.M., PLACE, C.S., TAYLOR-WEINER, A., WHITTAKER, S., KRYUKOV, G.V., HODIS, E., ROSENBERG, M., MCKENNA, A., CIBULSKIS, K., FARLOW, D., ZIMMER, L., HILLEN, U., GUTZMER, R., GOLDINGER, S.M., UGUREL, S., GOGAS, H.J., EGBERTS, F., BERKING, C., TREFZER, U., LOQUAI, C., WEIDE, B., HASSEL, J.C., GABRIEL, S.B., CARTER, S.L., GETZ, G., GARRAWAY, L.A., SCHADENDORF, D. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. **Cancer Discovery**. 4, 94–109. 2014.

VILLARES, G.J.; ZIGLER, M.; DOBROFF, A.S.; WANG, H.; SONG, R.; MELNIKOVA, V.O.; ET AL. Protease activated receptor-1 inhibits the Masp1 tumor-suppressor gene to determine the melanoma metastatic phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**. 108, 626–31. 2011.

VILLARES, G.J.; ZIGLER, M.; WANG, H.; MELNIKOVA, V.O.; WU, H.; FRIEDMAN, R.; LESLIE, M.C.; VIVAS-MEJIA, P.E.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A.K.; BAR-ELI, M. Targeting melanoma growth and metastasis with systemic delivery of liposome-incorporated protease-activated receptor-1 small interfering RNA. **Cancer Research**. 68, 9078–86. 2008.

VOLPI, N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from an old natural macromolecule. **Inflammopharmacology**. 6, 299–306, 2011.

VOLPI, N. Chondroitin sulfate: Structure, role and pharmacological activity. **Advances in Pharmacology**. 53. 2006.

VOUDOURI, K.; NIKITOVIC, D.; AIKATEBERDIAKI, D.; PAPACHRISTOU, D.J.; TSIAOISSIS, J.; SPANDIDOS, D.A.; TSATSAKIS, A.M.; TZANAKAKIS, G.N. Heparin regulates B6FS cell motility through a FAK/actin cytoskeleton axis. **Oncology reports**. 36, 2471-2480. 2016.

VU, T.K.; HUNG, D.T.; WHEATON, V.I.; COUGHLIN, S.R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**. 64, 1057-68, 1991.

WAGNER, C.R.; IYER, V.V.; MCINTEE, E.J.; Pronucleotides: toward the *in vivo* delivery of antiviral and anticancer nucleotides. **Medicinal Research Reviews**. 20:417 –451. 2000.

WALSH, C.T.; RADEFF-HUANG, J.; MATTEO, R.; HSIAO, A.; SUBRAMANIAM, S.; STUPACK, D.; BROWN, J.H. Thrombin receptor and RhoA mediate cell proliferation through integrins and cysteine-rich protein 61. **FASEB Journal**. 22, 4011–4021, 2008.

WANG, Q.; LIU, Q.; WANG, T.; YANG, H.; HAN, Z.; ZHANG, P. Endothelial cell protein C receptor promotes MGC803 gastric cancer cells proliferation and migration by activating ERK1/2. **Medical Oncology**. 32, 162. 2015.

WANG, W.K.; CHEN, M.C.; LEONG, H.F.; KUO, Y.L.; KUO, C.Y.; LEE, C.H. Connexin 43 suppresses tumor angiogenesis by down-regulation of vascular endothelial growth factor via hypoxic-induced factor-1alpha. **International Journal of Molecular Science**. 16, 439–451, 2014.

WARD, J.V. & PACKHAM, M.A. Characterization of the sulfated glycosaminoglycan on the surface and in the storage granules of rabbit platelets. **Biochimica et Biophysica Acta**. 583,196–207. 1979.

WEBBER, B. A., LAWSON, D. & COHEN, C. Maspin and Mutant p53 expression in malignant melanoma and carcinoma: use of tissue microarray. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**. 16, 19-23. 2008.

WEI, G., BAI, X., SARKAR, A. K., ESKO, J. D. Formation of HNK-1 determinants and the glycosaminoglycan tetrasaccharide linkage region by UDP-GlcUA:Galactose beta1, 3-glucuronosyltransferases. **Journal of Biological Chemistry**. 274, 7857–7864. 1999.

WILLIS, C.M. & KLUPPEL, M. Chondroitin Sulfate-E Is a Negative Regulator of a Pro-Tumorigenic Wnt/Beta-Catenin-Collagen 1 Axis in Breast Cancer Cells. **PLoS ONE** 9(8): e103966. 2014.

WOJTUKIEWICZ, M.Z.; HEMPEL, D.; SIERKO, E.; TUCKER, S.C.; HONN, K.V. Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**. 34, 775–796. 2015.

WOULFE, D.S., LILLIENDAHL, J.K., AUGUST, S., RAUOVA, L., KOWALSKA, M.A., ABRINK, M., PEJLER, G., WHITE, J.G., SCHICK, B.P. Serglycin proteoglycan deletion induces defects in platelet aggregation and thrombus formation in mice. **Blood**. 111, 3458–3467. 2008.

XIE, Q.; BAO, X.; CHEN, Z.H.; XU, Y.; KEEP, R.F.; MURASZKO, K.M.; ET AL. Role of protease-activated receptor-1 in glioma growth. **Acta Neurochirurgica Supplement**. 121,355 –360. 2016.

XIE, Q.; BAO, X.; CHEN, Z.H.; XU, Y.; KEEP, R.F.; MURASZKO, K.M.; XI, G.; HUA, Y. Role of Protease-Activated Receptor-1 in Glioma Growth. **Acta Neurochirurgica. Supplement.** 121, 355–60. 2016.

YAMADA, S. & SUGAHARA, K. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. **Current Drug Discovery Technologies.** 5, 289–301. 2008.

YANG, J.; PRICE, M.A.; LI, G.Y.; BAR-ELI, M.; SALGIA, R.; JAGEDEESWARAN, R.; CARLSON, J.H.; FERRONE, S.; TURLEY, E.A.; MCCARTHY, J.B. Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition. **Cancer Research.** 69, 7538–7547. 2009.

YAMADA, S., SUGAHARA, K. & ÖZBEK. Evolution of glycosaminoglycans. **Communicative & Integrative Biology,** 4:2, 150-158. 2011.

YATES, E.A.; MENEGHETTI, M.C.Z.; HUGHES, A.J.; RUDD, T.R.; NADER, H.B.; POWELL, A.K.; & LIMA, M.A. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. **Journal of the Royal Society Interface.** 6, 110, 2016.

YUAN, S.M.; NIE, W.C.; HE, F.; JIA, Z.W.; GAO, X.D. Kin2, the Budding Yeast Ortholog of Animal MARK/PAR-1 Kinases, Localizes to the Sites of Polarized Growth and May Regulate Septin Organization and the Cell Wall. **PLoS One.** 11, 4, 2016.

YUAN, S.M.; NIE, W.C.; HE, F.; JIA, Z.W.; GAO, X.D. KIN2, the Budding Yeast Ortholog of Animal MARK/PAR-1 Kinases, Localizes to the Sites of Polarized Growth and May Regulate Septin Organization and the Cell Wall. **PLoS One.** 11, 2016.

ZEFFERINO, R.; PICCOLI, C.; DI GIOIA, S.; CAPITANIO, N.; CONESE, M. Gap Junction Intercellular Communication in the Carcinogenesis Hallmarks: Is This a Phenomenon or Epiphenomenon? **Cell.** 8, 896. 2019.

ZHANG, X., & ZHANG, X. Connexin 43: Key roles in the skin (Review). **Biomedical Reports,** 6, 605-611. 2017.

ZHAO, X.; DING, E.Y.; YU, O.M.; XIANG, S.Y.; TAN-SAH, V.P.; YUNG, B.S.; HEDGPETH, J.; NEUBIG, R.R.; LAU, L.F.; BROWN, J.H. ET AL. Induction of the matricellular protein CCN1 through RhoA and MRTF-A contributes to ischemic cardioprotection. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology.** 75, 152–161. 2014.

ZHAO, Y.; ZHANG, D.; WANG, S.; TAO, L.; WANG, A.; CHEN, W.; ZHU, Z.; ZHENG, S.; GAO, X.; LU, Y. Holothurian glycosaminoglycan inhibits metastasis and thrombosis via targeting of nuclear factor- κ B/tissue factor/Factor Xa pathway in melanoma B16F10 cells. **PLoS ONE.** 8. 2015.



ANEXOS



8. ANEXOS

Tabela1. Parâmetros de aquisição de RMN

1D Protón:

Parâmetro	Valor
Programação de pulso	zgpr
Tempo de experimento	7m 50s
Tamanho do F.I.D. (TD)	12288
Número de Scans (NS)	64
Largura espectral (SW[ppm])	11.9878
Tempo de Aquisição Time (AQ[sec])	0.8540
Resolução FID (FIDRES[Hz])	1.1709
Atraso de relaxamento (d1[sec])	5

1D Carbono:

Parâmetro	Valor
Programação de pulso	zpgg30
Tempo de experimento	5h 15m 15s
Tamanho do F.I.D. (TD)	32768
Número de Scans (NS)	16384
Largura espectral (SW[ppm])	197.2059
Tempo de Aquisição (AQ[seg])	0.5505
Resolução FID (FIDRES[Hz])	1.8165
Atraso de relaxamento (d1[seg])	0.5

COSY:

Parâmetro	Valor F2	Valor F1
Programação de pulso	cosydfphpr.n3	
Tempo de experimento	7h 24m 32s	
Tamanho do F.I.D. (TD)	2048	512
Número de Scans (NS)	32	
Largura espectral (SW[ppm])	10.0138	10.0138
Tempo de Aquisição	0.1704	0.0426
Resolução FID (FIDRES[Hz])	5.8688	23.4751
Atraso de relaxamento (d1[seg])	1.3999	

TOCSY:

Parâmetro	Valor F2	Valor F1
Programação de pulso	ctocsypr.n3	
Tempo de experimento	8h 8m 54s	
Tamanho do F.I.D. (TD)	2048	512
Número de Scans (NS)	32	
Largura espectral (SW[ppm])	10.0138	10.0138
Tempo de Aquisição (AQ[seg])	0.1704	0.0427
Resolução FID (FIDRES[Hz])	5.8688	23.4427
Atraso de relaxamento (d1[seg])	1.3999	
Diferença de Tempo (d8[seg])	0.1199	

NOESY:

Parâmetro	Valor F2	Valor F1
Programação de pulso	noesygpphpr	
Tempo de experimento	*1d 4h 14m 35s – 1d 6h 53m 30s*	
Tamanho do F.I.D. (TD)	2048	512

Número de Scans (NS)	88	
Largura espectral (SW[ppm])	10.0138	10.0138
Tempo de Aquisição (AQ[seg])	0.1704	0.0426
Resolução FID (FIDRES[Hz])	5.8688	23.4751
Atraso de relaxamento (d1[seg])	2	
Diferença de Tempo (d8[sec])	*0.03 – 0.24*	

* Espectros de NOESY foram coletados com diferentes tempos: 0.03s, 0.06s, 0.12s e 0.24s, os quais deram os tempos de experimento de: 1d 4h 14m 35s, 1d 4h 38m 8s, 1d 5h 23m 15s e 1d 6h 53m 30s respectivamente.

HSQC:

Parâmetro	Valor F2	Valor F1
Programação de pulso	hsqcetgpsisp2	
Tempo de experimento	12h 26m 48s	
Tamanho do F.I.D. (TD)	4096	1024
Número de Scans (NS)	32	
Largura espectral (SW[ppm])	10.0138	199.9960
Tempo de Aquisição (AQ[seg])	0.3408	0.0170
Resolução FID (FIDRES[Hz])	2.9344	58.9511
Atraso de relaxamento (d1[seg])	1	

HMBC:

Parâmetro	Valor F2	Valor F1
Programação de pulso	hmbcgpplndqf	
Tempo de experimento	2d 18h 5m 56s	
Tamanho do F.I.D. (TD)	1024	400

Número de Scans (NS)	360	
Largura espectral (SW[ppm])	10.0138	199.9970
Tempo de Aquisição (AQ[seg])	0.0852	0.0066
Resolução FID (FIDRES[Hz])	11.7375	150.9156
Atraso de relaxamento (d1[seg])	1.5	

CURRICULUM VITAE

LAIS CRISTINA GUSMÃO FERREIRA PALHARES

Formação Acadêmica

Bacharel em Biomedicina

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Título da monografia: “Glicosaminoglicanos do tipo condroitim/dermatam sulfato obtidos do camarão *Litopenaeus vannamei* inibem a angiogênese e a coagulação in vitro”.

Período: 2009-2014

Orientador: Adriana da Silva Brito

Co-orientador: Suely Ferreira Chavante

Mestre em Bioquímica (Conceito CAPES 4)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Título da dissertação: “Um Dermatam sulfato antitrombótico do camarão *Litopenaeus vannamei* inibe a inflamação e angiogênese”.

Período: 2014-2016

Orientador: Suely Ferreira Chavante

Doutorado em Bioquímica (em andamento) (Conceito CAPES 4)

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Período: Abr/2016 – atual

Orientador: Suely Ferreira Chavante

Atividade Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Programa de Pós-graduação em Bioquímica

Cargo: Bolsista. Dedicção exclusiva.

Período: 2016 – atual.

University of Liverpool

Institute of Integrative Biology

Cargo: Bolsista pelo programa PDSE-CAPES/2018. Dedicção exclusiva.

Período: Out/2018 – Set/2019.

Participação em Eventos

- Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017. Potencial anticoagulante e antitumoral de um análogo de heparina obtido do camarão *Litopenaeus vannamei*. 2017. (**Prêmio Melhor Trabalho em Hemostasia**). (Congresso).
- Seminars in Biochemistry. Antithrombin and antiinflammatory activities of a chondroitin sulfate obtained from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Biochemistry department. University of Liverpool. 2019. (Simpósio).

- PALHARES, L. C. G. F. Avaliações de Trabalhos da área da Saúde no XXVIII Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica - eCICT. 2017. 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. (Bancas de comissões julgadoras).
- HOLANDA, C. M. C. X.; PALHARES, L. C. G. F.; MOTTA NETO, R. Participação em banca de Isabela Maria Fortaleza Neves Bomfim. RESISTÊNCIA BACTERIANA EM COCOS GRAM-POSITIVOS: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. (Bancas de trabalhos de conclusão)
- DA LUZ, J. R. D.; PALHARES, L. C. G. F.; DE ALMEIDA, M. DAS G. Participação em banca de Rebeca Gondim Cabral Medeiros de Azevedo. ETNOFARMACOLOGIA, FITOQUÍMICA, PROPRIEDADES TERAPEÚTICAS E TOXICIDADE DO GÊNERO *Turnera* (Passifloraceae): UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. (Bancas de trabalhos de conclusão).

Produção bibliográfica

Artigo (Publicado)

Título: “A further unique chondroitin sulfate from the shrimp *Litopenaeus vannamei* with antithrombin activity that modulates acute inflammation”. (2019)

Periódico: Carbohydrate Polymers

Fator de Impacto: 6.044.

ISSN: 0144-8617

QUALIS A1 (Ciências Biológicas II).

Artigos em produção

Título: “Effect of a chondroitin sulfate from *Litopenaeus vannamei* on melanoma progression and angiogenesis.”

Periódico: International Journal of Biological Macromolecules

Fator de Impacto: 4.784

QUALIS A1 (Ciências Biológicas II)

Título: “Shrimp chondroitin sulfate inhibits *in vivo* melanoma tumor growth and PAR-1 expression.”

Periódico: European Journal of Cancer.

Fator de Impacto: 6.680.

QUALIS A1 (Ciências Biológicas II).

Título: “Chemical Modifications of Glycosaminoglycans.”

Periódico: New Journal of Chemistry.

Fator de Impacto: 3.069.

QUALIS A1 (Ciências Biológicas II).

Demais Produções:

CAVALCANTE, R. S. ; BRITO, A. S. ; PALHARES, L. C. G. F. ; LIMA, M. A. ; CAVALHEIRO, R. P. ; Helena Nader ; SASSAKI, G. L. ; Suely Chavante . 2,3-di-O-Sulfo glucuronic acid: a natural, unmodified and unusual residue in a highly

sulfated chondroitin sulfate from *Litopenaeus vannamei*. CARBOHYDRATE POLYMERS, v. 183, p. 192-200, 2018.

BEZERRA, I. L. ; CAILLOT, A. R. C. ; PALHARES, L. C. G. F. ; SANTANA-FILHO, A. P. ; Suely Chavante ; SASSAKI, G. L. . Structural Characterization of Polysaccharides from Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc Wines: Anti-inflammatory activity in LPS Stimulated RAW 264.7 Cells. CARBOHYDRATE POLYMERS, v. 186, p. 91-99, 2018.

CAILLOT, A. R. C. ; BEZERRA, I. L. ; PALHARES, L. C. G. F. ; SANTANA-FILHO, A. P. ; Suely Chavante ; SASSAKI, G. L. . Structural characterization of blackberry wine polysaccharides and immunomodulatory effects on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. FOOD CHEMISTRY, v. 257, p. 143-149, 2018.

BRITO, ADRIANA S.; CAVALCANTE, RÔMULO S. ; CAVALHEIRO, RENAN P.; PALHARES, LAÍS C.G.F. ; NOBRE, LEONARDO T.D.B. ; ANDRADE, GIULIANNA P.V. ; NADER, HELENA B. ; LIMA, MARCELO A. ; CHAVANTE, SUELY F. . Anti-Ila activity and antitumor properties of a hybrid heparin/heparan sulfate-like compound from *Litopenaeus vannamei* shrimp. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v. 118, p. 1470-1478, 2018.

BRITO, ADRIANA S. ; CAVALCANTE, RÔMULO S. ; PALHARES, LAIS C.G.F. ; HUGHES, ASHLEY J. ; ANDRADE, GIULIANNA P.V. ; YATES, EDWIN A. ; NADER, HELENA B. ; LIMA, MARCELO A. ; CHAVANTE, SUELY F. . A non-hemorrhagic hybrid heparin/heparan sulfate with anticoagulant potential. CARBOHYDRATE POLYMERS, v. 99, p. 372-378, 2014.



A further unique chondroitin sulfate from the shrimp *Litopenaeus vannamei* with antithrombin activity that modulates acute inflammation



Lais C.G.F. Palhares^{a,c}, Adriana S. Brito^{a,b}, Marcelo A. de Lima^{c,d}, Helena B. Nader^d, James A. London^e, Igor L. Barsukov^e, Giuliana P.V. Andrade^a, Edwin A. Yates^{e,*}, Suely F. Chavante^{a,**}

^a Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

^b Faculdade de Ciências da Saúde do Tríplice, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, São Cruz, RN, Brazil

^c Molecular & Structural Biochemistry, School of Life Sciences, Keele University, Huxley Building, Keele, Staffordshire, ST5 5BG, United Kingdom

^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

^e Department of Biochemistry, Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, L69 7ZL, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:
Chondroitin sulfate
Inflammation
Shrimp
Thrombin

ABSTRACT

The detailed structure of a further Chondroitin Sulfate from *Litopenaeus vannamei* shrimp (sCS) is described. The backbone structure was established by ¹H/¹³C NMR, which identified 3-O-sulfated GlcA, 4-O-sulfated GalNAc, 6-O-sulfated GalNAc, and 4,6-di-O-sulfated GalNAc residues. GlcA is linked to GalNAc 4,6 di S and GlcA 3S is linked to GalNAc 4S, GalNAc 4,6 di-S and GalNAc6S residues. The anticoagulant properties of this sCS were evaluated by activated partial thromboplastin time, anti-IIa, anti-Xa and anti-heparin cofactor II-mediated activities, and sCS failed to stabilise antithrombin in a fluorescence shift assay. The anti-inflammatory effect of sCS was explored using a model of acute peritonitis, followed by leukocyte count and measurement of the cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α . The compound showed low clotting effects, but high anti-IIa activity and HCl-mediated thrombin inhibition. Its anti-inflammatory effect was shown by leukocyte recruitment inhibition and a decrease in pro-inflammatory cytokine levels. Although the biological role of sCS remains unknown, its properties indicate that it is suitable for studies of multi-potent molecules obtained from natural sources.

1. Introduction

Chondroitin sulfate (CS) is a sulfated linear polysaccharide of the glycosaminoglycan (GAG) family, composed of β (1–4) linked disaccharide units, themselves comprising β -D-glucuronic acid (GlcA) (1 \rightarrow 3) linked to N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) (Prabhakar & Sasisekharan, 2006; Tomatsu et al., 2015). Several types of CS structures have been reported and have been classified according to their GlcA and GalNAc sulfation patterns. Under this system of nomenclature, GalNAc residues sulfated at the C-4 and/or C-6 positions give rise to CSA [GlcA-GalNAc 4-O-sulfate], CS-C [GlcA-GalNAc 6-O-sulfate] and CS-E [GlcA-GalNAc 4,6-di-O-sulfate] units respectively. GlcA residues exhibit O-sulfation at C-2 and more rarely at C-3, giving rise to CS-D [GlcA 2-O-sulfate-GalNAc 6-O-sulfate], CS-K [GlcA 3-O-sulfate-GalNAc 4-O-sulfate] and CS-S [GlcA 2,3 di-O-sulfate-GalNAc 4 or 6-O-sulfate] units, respectively (Cavalcante et al., 2018; Nardini & Sugahara, 2006; Pavao, Vilela-Silva, & Mourão, 2006; Volpi, 2006).

Furthermore, sulfated fucose branches in GlcA residues are common in natural CS (Kale et al., 2013; Mou, Li, Qi, & Yang, 2018). It should be stressed, however, that CS polysaccharides isolated from invertebrates are rarely so well-defined; different sections of the CS chains often correspond to several of these supposed prototypical CS types. Recently, CS polysaccharides have attracted attention due to their participation in various biological events. Thus, the search for naturally occurring, novel CS (Deepa, Yamada, Fukui, & Sugahara, 2007; Higashi et al., 2015; Shetty et al., 2009) has expanded, along with investigations into the relationship between their structural features and biological functions.

Sulfated GAGs are covalently bound to proteins to form several proteoglycans (PGs) that participate in numerous physiological phenomena. (Izzo & Schaefer, 2015; Ustyuzhanina et al., 2018; Volpi, 2011). The variety in the position and degree of sulfation, size, number and disaccharide sequences that are inserted in the CSPGs, make CS heterogeneous molecules. The many biological effects of CS so far

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

** Corresponding author.

E-mail addresses: eayates@liverpool.ac.uk (E.A. Yates), suelychavante@gmail.com (S.F. Chavante).

