

TAMIRES GERHARDT SOARES

PAPEL DE GALACTANAS SULFATADAS NA
INFLAMAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR MEDIADA
POR LECTINAS



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Goés, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GOÉS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2016**

Trabalho realizado no Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, sob a orientação do professor Mauro Sérgio Gonçalves Pavão e coorientação do doutorando Felipe Teixeira.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

G429p Gerhardt Soares, Tamires
Papel de galactanas sulfatadas na inflamação e migração celular mediada por lectinas / Tamires Gerhardt Soares. -- Rio de Janeiro, 2016.
54 f.

Orientador: Mauro Sérgio Gonçalves Pavão.
Coorientador: Felipe Castro Oliveira de Brito Teixeira.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. Lectinas. 2. Câncer. 3. Metástase. 4. Migração celular. 5. Polissacarídeos. I. Gonçalves Pavão, Mauro Sérgio, orient. II. Castro Oliveira de Brito Teixeira, Felipe, coorient. III. Título.

“Dei um suspiro fundo. Um suspiro de verdade, de vontade, de saudade. Um suspiro imenso, profundo, intenso. Um suspiro que a gente só dá quando lembra de alguém que foi e é importante na nossa vida.”
Dedicado a minha querida avó Ana que tanto me amou e orou por mim e agora está nos braços do Pai.
“De janeiro a janeiro até o mundo acabar.”

AGRADECIMENTOS

Logo eu que sempre tenho tanta facilidade em escrever sobre meu amor e gratidão pelas pessoas, agora me encontro sem palavras diante de tanta coisa a agradecer. A primeira frase que vem a minha mente é: Esse é o fim de um novo começo. Hoje meu coração transborda de alegria e gratidão por essa caminhada tão difícil, mas tão cheia de amor.

Ao Deus da glória que com amor infinito planejou todos os meus dias, inclusive esse momento. Sou agradecida por todos os livramentos, pela saúde, pela força para levantar todos os dias, por toda bondade, misericórdia que me acompanharam durante esses 4 anos. Obrigada, meu querido Deus! A Ti toda honra e louvor, pois Tu és Digno!

A mulher de oração que me ama incondicionalmente, inclusive nos meus dias de estresse (desculpa, mãe!). Você é a melhor parte de mim e eu nem sei dizer o quão sou grata por tudo! Obrigada por cuidar tão bem de mim, obrigada pelo café na madrugada, pela comida quentinha todos os dias quando chegava da faculdade. Obrigada por me acalmar e me entender como ninguém. Obrigada por todas as lágrimas derramas quando me via triste ou desesperada com a faculdade. Mãe, obrigada e eu vou te amar eternamente e enquanto eu viver irei te honrar.

Ao meu herói, meu amigo de todas as horas, de conversas longas as terças na Av. Brasil na volta para casa. Ao meu pai que não mede esforços para me ver feliz. Pai, eu posso escrever milhares de folhas que ainda não seriam suficientes para dizer o tamanho do meu amor e gratidão a você. Não posso deixar de pedir desculpas por te acordar todos os dias às 4h para me levar ao ponto (sério, muito obrigada). Muitas pessoas me perguntavam por que eu não me mudava para mais próximo da faculdade. Pois bem, o motivo é que eu não conseguiria passar um dia sem você e minha mãe, ao chegar a casa minha bateria era recarregada só ao ver vocês. Eu amo vocês!

A enfermeira mais gata que pode existir na face da terra! Minha hermana mais nervosa do mundo (fica calma,haha). Jú, obrigada por todo apoio, por todas as conversas e por toda preocupação. Você é uma pessoa incrível e meu amor por você não tem limites. Obrigada pelo material que você deixou aqui em casa, foi de grande ajuda. Obrigada pelas comidas maravilhosas, e por esconder todas as minhas olheiras de madrugadas acordada estudando quando tínhamos alguma festa para ir (você é profissional), obrigada pelo colo certo e por todo amor que você tem por mim. Não tive a oportunidade de escolher você como irmã, mas se tivesse, escolheria você todos os dias. Te amo.

Ao meu cunhado que levou minha irmã embora (ainda vamos acertar isso). Obrigada pela amizade, carinho e oração. Obrigada por cuidar da minha irmã e por fazer parte da nossa família há tanto tempo. Obrigada, Rodrigo!

Ao meu lindo noivo que nem sei quantas vezes ouviu minhas reclamações, choro e palavras de desânimo. Você não sabe o tamanho da minha gratidão! Obrigada pelo abraço quentinho, o sorriso sempre a me acalantar e convite para passear. Cabe aqui um pedido de desculpa por todas as vezes que despejei todo meu estresse e nervosismo em você. Obrigada pelo apoio e preocupação, principalmente com minha saúde (prometo ser fitness ano que vem). Você é a minha linda espera de todo fim de semana e espero estar sempre ao seu lado. Obrigada Douglas e a contagem agora não vai ser mais para a monografia, mas sim para o casamento!

A toda minha família por todo carinho e entendimento. Obrigada por todas as palavras de incentivo e principalmente pelas orações. Com toda certeza vocês me ajudaram a chegar até aqui. Muito obrigada tios, tias, primos, primas e meus queridos avós.

Aos meus sogros Célia e Djacir e ao meu cunhado Dayvison que mesmo com toda a distância sempre estão torcendo por mim. Obrigada por todo carinho e por ter me recebido tão bem na família de vocês.

Não posso deixar de agradecer aos membros da minha amada Igreja que sempre me apoiaram e nessa reta final demonstraram um amor e carinho gigantesco por mim. Obrigada!

Quero agradecer e muito às pessoas mais incríveis que tive o prazer de conhecer nessa jornada. Não sei nem o que escrever diante de tantas histórias. Não foi fácil e nós sabemos. Meu eterno agradecimento a vocês por me aguentarem todos os dias (sei que não é fácil). Obrigada por vocês não terem me deixado desistir e por me abraçarem todo santo dia. Obrigada pelos

almoços, lanches, dinheiro emprestado (nem sei mais quem tá devendo a quem). Obrigada pelos materiais compartilhados e pelos papos no CA. Scar, obrigada por ser aquela que sempre recorro no momento de desespero total, por me ajudar SEMPRE a numerar as páginas dos trabalhos (sim, eu não consigo fazer sem você), por entender todas as vezes que não conseguir ler os artigos e você tinha que me explicar. Obrigada miga! Lulis, minha parceira de sofrência. Muito obrigada por todas as conversas no privado e por me fazer colocar os pés no chão. Obrigada por ser tão parecida comigo (até hoje me assusto) e por ter um coração tão grande. Obrigada! Quezia, a mais guerreira que eu conheço!!! Amiga, sou grata pelo ombro que sempre esteve pronto a me consolar, por todas as histórias engraçadas que você me fez viver. Já estou morrendo de saudades de você, não posso acreditar que você vai nos deixar (please, fique!). Obrigada, por tudo! EU AMO VOCÊS! Não posso deixar de agradecer a Thais (que não nos aguentou e fugiu. Brincadeira) por todo carinho mesmo não me vendo mais todos os dias e ao Bruno por toda alegria e episódios de séries divididos.

Minhas amigas de sempre Verônica, Tamires, Mariana e Viviane obrigada por me entenderem sempre que não posso ir a um encontro e por me amarem mesmo assim (não desistam de mim). Quero dizer que agora estou disponível para lanches sem fim. Obrigada!

Ao meu orientador que me recebeu tão bem no laboratório mesmo eu não sabendo nada (não que agora eu saiba muita coisa). Muito obrigada pela confiança Mauro.

Ao meu coorientador Felipe que mesmo com todas as diferenças procurou me entender e me apoiar. Obrigada por ter dividido seu conhecimento comigo e pela oportunidade de crescimento e amadurecimento. A Mariana Soares por ter ficado até às 21h comigo no laboratório quando estava toda enrolada com os experimentos, obrigada! A Joice (obrigada por todas as conversas), Maria Júlia (obrigada por trocar o meio das minhas células), Jú Maria que tão gentilmente me “emprestou” o seu laboratório para que eu conseguisse terminar a tempo e a Vitória pela alegria de sempre. Ao Wallace por toda ajuda, ensinamentos e paciência. A professora Mariana Stelling por transmitir sempre tanta tranquilidade e por ter aceitado com tanta alegria participar da minha banca.

Ao laboratório de tecido conjuntivo em especial ao Eduardo que me ajudou com a purificação da ascídia e ao Bruno que sempre entendeu meu desespero e necessidade em usar o liofilizador e por ter me deixado furar fila do HPLC. Obrigada!

Ao André que sempre com toda paciência do universo resolveu minhas matérias sobrepostas e minhas situações burocráticas. André, nunca se aposente!

A todos os membros da banca.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Goés na pessoa da diretora Alane Vermelho.

As agências CNPq, FAPERJ e CAPES.

Obrigada!

TAMIRES GERHARDT SOARES
PAPEL DE GALACTANAS SULFATADAS NA INFLAMAÇÃO E MIGRAÇÃO
CELULAR MEDIADA POR LECTINAS
Orientador: Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Resumo da monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação do RCS trabalho de conclusão de curso.

Desde a descoberta do câncer, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de identificar as moléculas envolvidas na progressão da doença e aumentar a sobrevida dos pacientes. Entre as moléculas que participam do desenvolvimento tumoral se encontram as lectinas que são proteínas com capacidade de se ligar a carboidratos ou moléculas que contenham açúcar em sua estrutura. As galectinas são lectinas que se ligam a resíduos β -galactosídicos em carboidratos e possuem diversas funções no organismo. A galectina-3 (Gal-3) é uma lectina e apresenta capacidade regulatória em diversas vias metabólicas e de sinalização associadas à transformação maligna, crescimento tumoral, proliferação, invasão e angiogênese. As selectinas, outra família de lectinas, são encontradas na membrana de leucócitos, plaquetas e células endoteliais e são capazes de se ligar a glicoconjugados específicos presentes na superfície das células alvo e tem atividade, por exemplo, de promover a adesão dos leucócitos no endotélio ativado durante a inflamação levando a desaceleração e rolamento de leucócitos no endotélio vascular, permitindo assim sua chegada ao sítio inflamatório. Polissacarídeos sulfatados, como a heparina, têm sido utilizados como fármacos devido a sua capacidade de prevenir a metástase, trombose e inflamação associada ao câncer. Nosso objetivo nesse trabalho é avaliar se duas galactanas sulfatadas isoladas de invertebrados marinhos são capazes de inibir *in vitro* a migração celular promovida por Gal-3 extracelular, em um sistema de *transwell*, utilizando a célula de câncer de mama MDA-MB-231 e investigar, *in vivo*, os efeitos destes polissacarídeos na inflamação aguda em um modelo dependente de P-selectina. Para isso utilizamos galactanas extraídas de óvulos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e da túnica da ascídia *Styela plicata*. Estas amostras são extraídas por degradação proteica com posterior purificação em cromatografia de troca iônica e exclusão de tamanho. No ensaio de migração em *transwell* as células foram tratadas com Gal-3 e com os polissacarídeos, sendo realizada a análise da atividade inibitória das galactanas sulfatadas. *In vivo*, a peritonite aguda foi provocada por injeção intraperitoneal de tioglicolato em camundongos C57/BL6 após um tratamento intravenoso com a galactana sulfatada do *E. lucunter*, e realizamos uma contagem dos leucócitos polimorfonucleares que migraram para o local da inflamação. Com este projeto, esperamos contribuir na identificação de novos compostos que possam ajudar no tratamento de pacientes com câncer.

Palavras chave: Câncer, migração, lectinas, polissacarídeos, inflamação

ABSTRACT
TAMIRES GERHARDT SOARES

**ROLE OF SULFATED GALACTANS IN INFLAMMATION AND CELL
MIGRATION MEDIATED BY LECTINS**

Orientador: Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Abstract da monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Goés da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação do RCS trabalho de conclusão de curso.

Since discovery of cancer, many studies on how they have developed na end to identify as molecules involved in the progressively disease and increase patient survival. Among the molecules involved in tumor development are lectins, proteins that bind to carbohydrates or molecules that contain sugar in their structure. Galectins are lectins that bind to β -galactoside residues in carbohydrates. Galectin-3 (Gal-3) has regulatory capacity in several metabolic and signaling pathways associated with malignant transformation, tumor growth, proliferation, invasion and angiogenesis. The selectins, another family of lectins, are found in the membrane of leukocytes, platelets and endothelial cells. They bind to specific glycoconjugates present on the surface of the target cells and have the activity, for example, of facilitating the adhesion of the leukocytes in the activated endothelium during inflammation. This leads to the deceleration and rolling of leukocytes in the vascular endothelium and alllows their arrival at the inflammatory site. Heparin is a glycosaminoglycan capable to prevent metastasis, thrombosis and inflammation associated with cancer. Other sulfated polysaccharides were also able to produce this effect in vivo studies. Our objective is to evaluate whether two sulfate galactans isoleted from marine invertebrates are capable of inhibiting, in vitro, the transwell migration of the recombinant gal-3 promoted MDA-MB-231 breast câncer cell and investigating in vivo its anti-inflammatory effects in a model of acute inflammation dependent on P-selectin. For this we use galactans extracted from eggs of the sea urchin *Echinometra lucunter* and the *Styela plicata* ascidian tunic. These samples are purified by lipid protein degradation with subsequent isolation in ion-exchange chromatography. In the transwell migration assay the Gal-3 treatment and the analysis of the inhibitory activity of the sulfated galactans are done, in vivo, acute peritonitis was induced by

intraperitoneal injection of thioglycollate in C57/Bl6 mice following an intravenous treatment with the sulfated galactans, and we counted the leukocytes that migrated to the site of inflammation. The two galactans have already been isolated and *purified* *Echinometra lucunter* galactan has already been tested for anti-inflammatory activity and a pilot experiment was conducted on inhibition of Gal-3 mediated migration. With this project, we hope to contribute to the research of new compounds that may help in the treatment of cancer patients.

Key words: Cancer, migration, Polysaccharides, lectin, inflammation

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Representação da heparina | 3 |
| Figura 2. Estrutura molecular das galactanas | 5 |
| Figura 3. Estrutura das galectinas | 9 |
| Figura 4. Interações envolvendo galectina-3 | 10 |
| Figura 5. Possíveis estruturas da galectina-3 | 11 |
| Figura 6. Estágios da inflamação aguda | 14 |
| Figura 7. Explicação do ensaio de <i>transwell</i> | 22 |
| Figura 8. Extração da galactana do <i>E.lucunter</i> | 23 |
| Figura 9. Eletroforese do produto da extração do <i>E.lucunter</i> | 24 |
| Figura 10. Extração da galactana da <i>S.plicata</i> | 25 |
| Figura 11. Eletroforese do produção da extração da <i>S.plicata</i> | 25 |
| Figura 12. Teste de concentração de galectina-3 | 27 |
| Figura 13. Experimento de migração- <i>E.lucunter</i> | 29 |
| Figura 14. Experimento de migração- <i>S.plicata</i> | 31 |
| Figura 15. Ensaio de inflamação aguda dependente de P-selectina | 33 |

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| Resumo..... | viii |
| ABSTRACT..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| 1.1 Câncer e progressão tumoral | 1 |
| 1.2 Carboidratos | 2 |
| 1.3 Galactanas sulfatadas | 4 |
| 1.4 Lectinas | 5 |
| 1.5 Lectinas em invertebrados marinhos | 8 |
| 1.6 Galectinas | 8 |
| 1.7 Galectina-3 e o câncer..... | 12 |
| 1.8 P-selectina e a inflamação | 13 |
| 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO | 16 |
| 3. OBJETIVO DO ESTUDO | 17 |
| 3.1 Objetivos específicos | 17 |
| 4.MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 4.1 Obtenção e coleta dos materiais | 18 |
| 4.1.2 <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Styela plicata</i> | 18 |
| 4.2 Extração dos polissacarídeos do ouriço-do-mar | 18 |
| 4.3 Extração dos polissacarídeos da ascídia | 18 |
| 4.4 Purificação dos polissacarídeos | 19 |
| 4.4.1 <i>Echinometra lucunter</i> | 19 |
| 4.4.2 <i>Styela plicata</i> | 20 |
| 4.4.3 Eletroforese em gel de agarose..... | 20 |
| 4.5 Cultura de células | 20 |
| 4.6 Experimento <i>in vivo</i> | 21 |
| 4.7 Migração em sistema de <i>transwell</i> | 21 |
| 4.8 Modelo de peritonite aguda | 22 |
| 5. RESULTADOS | 23 |
| 5.1 Isolamento da galactana sulfatada do ouriço-do-mar <i>Echinometra lucunter</i> | 23 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.2 | Isolamento das galactanas sulfatadas da ascídia <i>Styela plicata</i> | 24 |
| 5.3 | Galectina-3 extracelular promove a migração das células MDA-MB 231 | 26 |
| 5.4 | Ensaio de migração em sistema <i>transwell</i> | 28 |
| 5.5 | Ensaio de migração em sistema <i>transwell</i> da galactana da <i>Styela plicata</i> | 30 |
| 5.6 | Ensaio de peritonite aguda induzida por tioglicolato..... | 32 |
| 6 | DISCUSSÃO | 34 |
| 7. | CONCLUSÃO | 37 |
| 8. | REFERÊNCIAS | 38 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e progressão tumoral

O estabelecimento do câncer é um processo que ocorre em várias etapas, que tem em comum o fato de levar uma célula normal a sofrer diversas mutações em seu material genético a ponto de torna-la altamente proliferativa e invasiva. (Balmain *et al.*, 1993). Estas etapas podem ser observadas ao analisar pacientes com diferentes níveis de desenvolvimento tumoral, revelando uma série de características pré-neoplásicas até características que apresentam um estado de alta malignidade, ou seja, com uma grande capacidade de se espalhar para outros locais do corpo (Foulds, 1954). Estas modificações tornam-se ainda mais evidentes quando olhamos diretamente para o genoma das células tumorais e constatamos mudanças pontuais ou mudanças epigenéticas que, em alguns, casos pode levar a transmissão hereditária (Kinzler e Vogelstein, 1996).

A palavra neoplasia significa ‘novo crescimento’, e uma das principais diferenças entre uma célula normal e uma neoplásica (**Tabela 1**) é que muitas vezes o crescimento e proliferação desta última persiste mesmo na ausência de fatores de crescimento e de mitógenos. No entanto, para que as células adquiram esta capacidade, elas precisam se multiplicar excessivamente e ir contra as restrições de crescimento impostas pelas células vizinhas normais. O que realmente distingue um tumor benigno do maligno é a capacidade de invadir outros tecidos e formar novos tumores (Belizário E.J, 2002).

Tabela 1. Principais diferenças entre tumores benignos e malignos

| Crítérios | Benignos | Malignos |
|---------------------|--|---|
| Encapsulação | Presença frequente | Geralmente ausente |
| Crescimento | Expansivo e bem delimitado | Infiltrativo com delimitação imprecisa |
| Morfologia | Reproduz o aspecto do tecido de origem | Caracteres diferentes do tecido de origem |
| Mitoses | Raras e típicas | Frequentes e atípicas |
| Metástases | Não ocorrem | Frequentes |

Adaptado de (Cartilha de políticas públicas de saúde. Disponível em [HTTP://bv'sms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf](http://bv'sms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf)).

A metástase é um processo dinâmico. Para penetrar nos tecidos, a célula precisa expressar genes que aumentem a sua capacidade de aderência aos vasos sanguíneos, e que promovam a degradação da matriz extracelular. As novas células tumorais precisam, então, produzir fatores angiogênicos em maior quantidade, para estimular a formação de novos vasos sanguíneos, por onde chegarão nutrientes e oxigênio necessário para a sua sobrevivência (Belizário E.J, 2002)

O potencial migratório e invasivo das células tumorais são características básicas do processo de desenvolvimento do câncer maligno e incluem etapas como: invasão local, entrada nos vasos sanguíneos, transporte na circulação, extravasamento, formação de micrometástases e colonização (Valastyan e Weinberg, 2011).

O controle do crescimento celular é realizado por substâncias como fatores de crescimento que transmitem sinais de uma célula a outra, receptores específicos para fatores de crescimento, moléculas de transdução de sinal que ativam a cascata de sinalização dentro das células e fatores de transcrição nuclear (Corvelho, 2002).

Muitas células e moléculas estão diretamente associadas ao processo de transformação maligna, o que torna muito difícil desvendar o mecanismo envolvido nessa patologia. Algumas moléculas são de extrema importância em um tipo de câncer, mas em outros não são tão essenciais. Um grupo de moléculas que se relaciona de forma bem íntima com o processo tumoral são as lectinas (Goldstein *et al.*, 1978), que serão abordadas no decorrer do trabalho.

1.2 Carboidratos

Os carboidratos que também são conhecidos como glicídios ou açúcar são de grande importância na composição do organismo e fazem parte do grupo de moléculas mais abundante na natureza. Durante muito tempo acreditou-se que essas moléculas tinham apenas função energética no organismo mas com o avanço dos estudos desses compostos foi possível descobrir outros eventos biológicos relacionados a carboidratos, como o reconhecimento e a sinalização celular, tornando possível entender os mecanismos envolvidos em algumas doenças causadas por deficiência ou excesso dessas moléculas (Pomim, V.H e Mourão, Paulo A.S, 2006).

O avanço da ciência permitiu conhecer, de forma mais detalhada, as propriedades físico-químicas dos carboidratos, o que resultou na utilização dessas

características em uma grande variedade de processos industriais, como nas áreas alimentar e farmacêutica (Pomim V.H, 2006). Um dos carboidratos que possui uma grande utilização médica é a heparina (**Figura 1**), que é um polissacarídeo polissulfatado, composto por unidades dissacarídicas contendo ácido idurônico 2-sulfatado (IdoA), glicosamina 2,6- dissulfatada (GlcN) e ácido glicurônico não sulfatado (GlcA), podendo ser encontradas pequenas variações em heparinas obtidas de diferentes animais (Nader *et al.*, 2001). Comercialmente ela é obtida de mucosa intestinal ou pulmonar de suínos ou bovinos, sendo caracterizada como uma mistura heterogênea de polissacarídeos e o peso molecular de sua cadeia pode variar de 5 kDa a 30 kDa (Hirsh *et al.*, 1998). A heparina é utilizada como uma importante ferramenta terapêutica por possuir ação antitrombótica, sendo utilizada desde a década de 1930 (Ortel T., 1998; Walenga e Bick, 1998). Vários efeitos adversos são relacionados ao seu uso como: hemorragias, osteoporose, eosinofilia, reações cutâneas, trombocitopenia, entre outros (Ortel T., 1998; Walenga; Bick, 1998; Crowther, Ginsberg e Tollefsen, 2000). A necessidade de maior produção de medicamentos deste tipo vêm aumentando assim como o interesse pela busca por alternativas para esse composto. Recentemente, o uso de polissacarídeos de animais marinhos como ouriço-do-mar, algas e ascídias tem sido explorado devido às propriedades semelhantes às da heparina (Pomim V.H e Mourão, Paulo A.S, 2006).

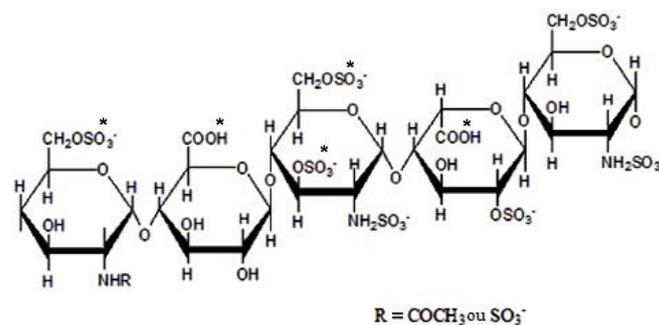


Figura 1. Estrutura pentasacarídica da heparina: [-4)- α -D-GlcNAc(6SO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- α -DGlcNSO₃⁻ (3,6 diSO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -L-IdoA(2SO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -DGlcNSO₃⁻ (6SO₃⁻)-(1 -)]. Esta é a estrutura mínima que possui alta afinidade a antitrombina, quando está presente no plasma inibe enzimas da coagulação. Adaptado de: Mullory, 2005.

Os avanços no estudo dos carboidratos ajudaram a conhecer a ação farmacológica de alguns destes polissacarídeos e desenvolver novos tipos de compostos com finalidade terapêutica. (Pomim V.H e Mourão, Paulo A.S, 2006).

Diante disso, muitos compostos estão sendo testados no mundo em busca de novos fármacos.

1.3 Galactanas sulfatadas

Galactanas são polímeros geralmente compostos por unidades repetidas de galactopiranosil que possuem sulfatação nas ramificações na forma α -L, α -D ou β -D. Elas são moléculas de alto peso molecular (geralmente mais de 100 kDa) isoladas principalmente de organismos marinhos como algas e invertebrados (Pomin, 2012). Alguns destes compostos, especialmente os extraídos de alga vermelha, urocordados e equinodermas, mostram estruturas químicas bastante regulares, possuindo padrões de sulfatação bem definidos. Essa estrutura regular é especialmente rara entre quaisquer outros polissacarídeos de alto peso molecular encontrados na natureza (Pomin, 2012)

As galactanas possuem uma grande quantidade de efeitos biológicos para os quais já foram descritos (Cumashi *et al.*, 2007). Nos últimos anos muitos grupos de pesquisa têm procurado possíveis utilizações terapêuticas neste grupo de moléculas, e já foram descritas algumas ações, como na inflamação, coagulação, trombose, angiogênese, câncer, estresse oxidativo, cicatrização, entre outros. (Pomin, 2012)

O potencial anti-inflamatório desse composto está relacionado à ação em diversos pontos durante o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. Porém a ação mais relevante já descrita é a inibição das selectinas nas células endoteliais, reduzindo o rolamento de leucócitos (Cumashi *et al.*, 2007);(Proudfoot, 2006).

Os potenciais anticoagulantes e antitrombóticos das galactanas são os mais estudados dentre todos os seus efeitos conhecidos. Isso ocorre devido à necessidade do desenvolvimento de novos fármacos em função do aumento da incidência de doenças cardiovasculares (Yu *et al.*, 2000). Já em relação à angiogênese, esse polissacarídeo age contra a neovascularização principalmente pelo seu potencial inibitório contra os principais agentes pró-angiogênicos (Koyanagi *et al.*, 2003).

Atualmente alguns grupos de pesquisa vem tentando descobrir se galactanas são também capazes de atuar em moléculas específicas como a Galectina-3 (Gal-3), que foi

descrita como sendo um importante marcador para várias etapas do processo de metástase. (Ochieng; Furtak; Lukyanov, 2004); (Liu; Rabinovich, 2005)

As galactanas usadas neste trabalho foram extraídas da matriz gelatinosa que recobre os óvulos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e da túnica da ascídia *Styela plicata*. Uma galactana é 2-O-Sulfatada 1 → 3 ligada (*Echinometra lucunter*) e a outra é 3-O-Sulfatada 1 → 4 ligada e 2 → 1 ramificada (*Styela plicata*). (**Figura 2**)

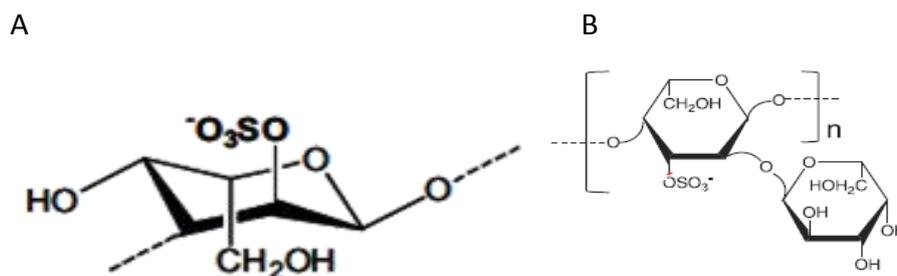


Figura 2. Estrutura química das galactanas sulfatadas. Em (A) Galactana do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* [\rightarrow 3- α -L-Galp-2(OSO₃⁻)- e em (B) a galactana da ascídia *Styela plicata* { \rightarrow 4)- α -L-Galp-2[\rightarrow 1)- α -L-Galp]-3(OSO₃⁻). Adaptado de Pomin H. Vitor, 2008 e 2012.

Os polissacarídeos extraídos da matriz gelatinosa do *Echinometra lucunter* estão relacionados à transdução de sinal que dá início a reação acrossomal nestes animais (Rothschild, 1949). Eles também são responsáveis por evitar a fecundação cruzada entre espécies, visto que cada polissacarídeo é espécie-específico (Alves *et al.*, 1997); (Vilela-Silva; Hirohashi; Mourão, 2008). A função e importância da galactana na sobrevivência da ascídia *Styela plicata* ainda não foi entendida completamente.

Nosso grupo já realizou pesquisas com a galactana do *Echinometra lucunter* e sua interação com plaquetas no contexto de metástase. Este trabalho visa ampliar um pouco mais a linha de atividade biológica da *Echinometra lucunter* e comparar sua ação com a galactana da *Styela plicata* na interação com a molécula de galectina-3.

1.4 Lectinas

As primeiras lectinas descritas foram encontradas em plantas e durante muito tempo foi objeto de estudo de vários pesquisadores. Estes estudos iniciais foram

essenciais para a análise de estrutura e função de glicoconjugados presentes em células animais (Drickamer; Taylor, 1993). Em 2001, Lis e Sharon (Sharon; Lis, 2001) publicaram uma revisão sobre lectinas e descreveram a possível presença dessas proteínas em células animais, fazendo com esse estudo fosse rapidamente difundido.

As lectinas são definidas como proteínas que reconhecem e se associam, de forma reversível, com elevada afinidade e especificidade, a carboidratos, porém não apresentam atividade enzimática (Van Damme *et al.*, 1995) (Holíková *et al.*, 2002); (Loris, 2002). Elas são moléculas ubíquas, sendo capazes de interagir com os açúcares através de uma região denominada de Domínio de Reconhecimento a Carboidratos (CRD), que é conservada em cada tipo de lectina (Ni; Tizard, 1996). O processo de interação com os carboidratos acontece através de pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals, que são estabelecidas entre os carboidratos e os resíduos de aminoácidos presentes em um sítio específico da lectina (Weis; Drickamer, 1996). Em consequência dessa característica de ligação ao carboidrato, as lectinas conseguem participar de uma grande variedade de processos biológicos, como: reconhecimento celular, interação entre células, fertilização, adesão celular, interação entre célula-matriz, aglutinação de células e bactérias (Ramos *et al.*, 2001).

A ligação que as lectinas promovem com os receptores glicídicos da membrana celular é a base molecular para as várias respostas que essas proteínas são capazes de induzir nos mais diversos sistemas biológicos. Quando interagem com os glicoconjugados presentes na superfície celular, as lectinas podem levar a formação de ligação cruzada entre células adjacentes, causando aglutinação das mesmas (Hilgert *et al.*, 1983); (Van Damme *et al.*, 1995).

As lectinas possuem especificidade em relação aos diferentes carboidratos, isso possibilita a sua utilização em pesquisas biológicas e médicas, tornando-se ferramentas importantes no processo de purificação e caracterização de polissacarídeos ou glicoconjugados, caracterização de grupos sanguíneos, identificação de células malignas, diferenciação de células patogênicas e caracterização dos estágios de desenvolvimento de microrganismos (Shibuya *et al.*, 1986)

Peumans e Van Damme em 1995 (Van Damme *et al.*, 1995), agruparam as lectinas em diferentes classes: Merolectinas são proteínas de pequeno tamanho e que possuem apenas um domínio de ligação ao carboidrato, sendo assim incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células; Halolectinas possuem, no mínimo, dois

domínios idênticos ou homólogos que se ligam ao mesmo carboidrato ou açúcares de estrutura similar. Estas proteínas são conhecidas como moléculas di ou multivalentes, capazes de promover a aglutinação de células e/ou precipitar glicoconjugados; Quimerolectinas possuem um ou mais domínios que podem se ligar a carboidratos, associado(s) a outro domínio distinto, que possui atividade enzimática ou outra atividade biológica que não depende do domínio de ligação ao carboidrato. Em 1998, Van Damme *et al.*, (Peumans; Van Damme, 1998) sugeriram a existência de um quarto grupo, o das superlectinas, que são proteínas quiméricas, constituídas de, no mínimo, dois domínios ligantes de carboidratos, que possuem diferenças estruturais e reconhecimento de carboidratos distintos.

As lectinas formam um grupo de proteínas heterogêneas que variam de acordo com o tamanho, estrutura e organização molecular, porém possuem a característica de reconhecer e interagir com sítios contendo glicoconjugados (Sharon; Lis, 2001). Inicialmente as lectinas foram chamadas de aglutininas, termo que é derivado da capacidade de aglutinar células vermelhas do sangue. A primeira aglutinina a ser isolada foi em um vegetal, *Ricinus communis*, por Stillmark, em 1888. A primeira aglutinina animal foi isolada em 1960 do veneno da cascavel *Crotalus durissus* (Kilpatrick, 2002).

As lectinas animais são classificadas de acordo com a homologia de suas estruturas primárias. Sendo assim, já foram descritas cerca de 10 famílias de lectinas: Tipo S, Tipo I, Tipo P, Tipo L, Anexinas, Calreticulinas/Calnexinas, Discoidinas, Eglectinas, Eel aglutininas, Tipo fibrinogênio, Pentraxinas, além das galectinas e lectinas do Tipo-C, que são as duas maiores famílias de lectinas do reino animal (Kilpatrick, 2002).

Estas moléculas são abundantes na natureza e podem ser encontradas em quase todos os organismos, vegetais, vírus, bactérias, mamíferos e outros grupos de invertebrados (Kilpatrick, 2002) (Gerlach *et al.*, 2005). Nos animais invertebrados dois tipos de lectinas são observados: as citoplasmáticas, que são extraídas com soluções aquosas e salinas e as lectinas de membrana que necessitam do uso de detergentes para a sua solubilização (Kilpatrick, 2002)

Embora as lectinas presentes nos animais apresentem uma variedade de funções, a maioria é considerada como moléculas de reconhecimento, uma vez que agem no processo de defesa contra patógenos e participam do tráfego celular (Kilpatrick, 2002).

Hoje se sabe que elas também podem atuar promovendo a estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas (Lis; Sharon, 1973).

1.5 Lectinas em invertebrados marinhos

Os invertebrados não possuem uma sistema imune adaptativo baseado na especificidade de antígenos e receptores como os vertebrados possuem (Marques e Barracco, 2000). Na ausência de mediadores da imunidade adquirida, lectinas presentes em tecidos dos invertebrados agem como anticorpos naturais, fornecendo o que seria a primeira linha de defesa, podendo, assim, desencadear um importante mecanismo efetor na eliminação de patógenos (Yang e Yoshino, 1990).

Devido a característica das lectinas de reconhecer carboidratos e promover aglutinação de diferentes células, podemos inferir que são moléculas que possuem papel considerável no reconhecimento do material exógeno (Marques e Barracco, 2000).

Atualmente a família das galectinas e das selectinas, especialmente a P-selectina, tem sido estudadas devido sua participação no desenvolvimento do câncer e elas são o alvo do nosso presente estudo.

1.6 Galectinas

As galectinas fazem parte da família das lectinas animais que é definida por sua habilidade de reconhecer glicoconjugados que possuem β -galactosídeos, através de seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD). Algumas galectinas estão presentes em diversos tecidos enquanto outras apresentam uma localização mais específica. Elas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos como proliferação, adesão, diferenciação celular, sinalização, apoptose, resposta imune, angiogênese e progressão tumoral (Liu; Rabinovich, 2005); (Fortuna-costa *et al.*, 2014); (Punt *et al.*, 2015).

Até o momento já foram identificadas 15 galectinas (**Figura 3**) presentes em mamíferos, sendo 11 encontradas em humanos (Punt *et al.*, 2015). Os membros desta família foram separados em três grupos de acordo com sua estrutura molecular sendo: Galectinas monovalentes, caracterizadas por possuírem uma única Região de Reconhecimento ao Carboidrato (CRD), podendo formar homodímeros, tornando-se

dessa forma bivalentes (fazem parte deste grupo as galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15); Galectinas bivalentes que possuem dois CRDs que são unidos por uma sequência de repetição em tandem (galectinas 4, 6, 8, 9, 12); E galectinas quiméricas, caracterizadas por possuírem um único CRD conectado a uma sequência repetida de aproximadamente 100 aminoácidos, semelhante ao colágeno (Galectina-3). Essa sequência é rica em prolina, tirosina e glicina e possui um pequeno domínio N-terminal que é composto por 12 aminoácidos e que possui sítio de fosforilação em serina (Liu; Rabinovich, 2005).

O Domínio de Reconhecimento de Carboidrato presente nas galectinas é conservado, possuindo aproximadamente 130 aminoácidos. Entretanto, apenas um número restrito dos resíduos de aminoácidos do CRD irão mediar a interação com os glicanos (Liu; Rabinovich, 2005) (Liu; Rabinovich, 2005); (Rabinovich e Toscano, 2009).

| TIPO | ESTRUTURA | GALECTINA |
|----------|---|------------------------|
| Uma CRD |  | 1,2,5,7,10,11,13,14,15 |
| |  | 3 |
| Duas CRD |  | 4,6,8,9,12 |

Figura 3. Estrutura de galectinas caracterizada de acordo com a sua região de reconhecimento a carboidrato (CRD). Galectina dimérica consiste em duas subunidades iguais que estão associadas uma a outra. Galectinas tandem possuem dois CRDs distintos ligados por uma ligação peptídica. A galectina quimera pode estar presente tanto na forma de monômero como multivalente. Adaptado de Liu e Rabinovich, 2005

A galectina-3 (Gal-3) é a única representante do tipo quimera, sendo composta por 250 resíduos de aminoácidos e com peso aproximado de 31kDa (Liu; Rabinovich, 2005); (Newlaczyl; Yu, 2011). Estudos demonstraram que mecanismos epigenéticos podem controlar a expressão de Gal-3, podendo levar a transformação maligna e progressão tumoral (Jin *et al.*, 2005).

Um dos principais locais onde a Gal-3 pode ser encontrada é no citoplasma. Pode, também, atravessar membranas e ser encontrada em mitocôndrias (Yu *et al.*, 2000) e no núcleo (Moutsatsos *et al.*, 1987); (Paron *et al.*, 2003); Carvalho *et al.*,

2014). Essa lectina não possui o peptídeo sinal que direciona as proteínas para a via secretória clássica mesmo assim ela pode ser encontrada no meio extracelular. Ainda não se conhece o mecanismo responsável por sua secreção, mas existem algumas sugestões de que isso ocorra através de vesículas extracelulares (Mehul e Hughes, 1997); (Baptiste *et al.*, 2007); (Fei *et al.*, 2015) e que o domínio N-terminal possa ser responsável por localizar a Gal-3 nessas estruturas (Menon e Hughes, 1999). O fato de estar no meio extracelular possibilita que a Gal-3 interaja com inúmeros ligantes, tanto na matriz extracelular como na superfície celular (**figura 4**). Essa rota incomum de secreção evita a ligação prematura de galectinas a oligossacarídeos em glicoproteínas nascentes. Após a liberação da galectina no meio extracelular elas podem se ligar a β -galactosídeos presentes em glicoconjugados que se encontram na superfície da célula, resultando na modulação da sinalização, adesão e sobrevivência da célula (Rabinovich *et al.*, 2002).

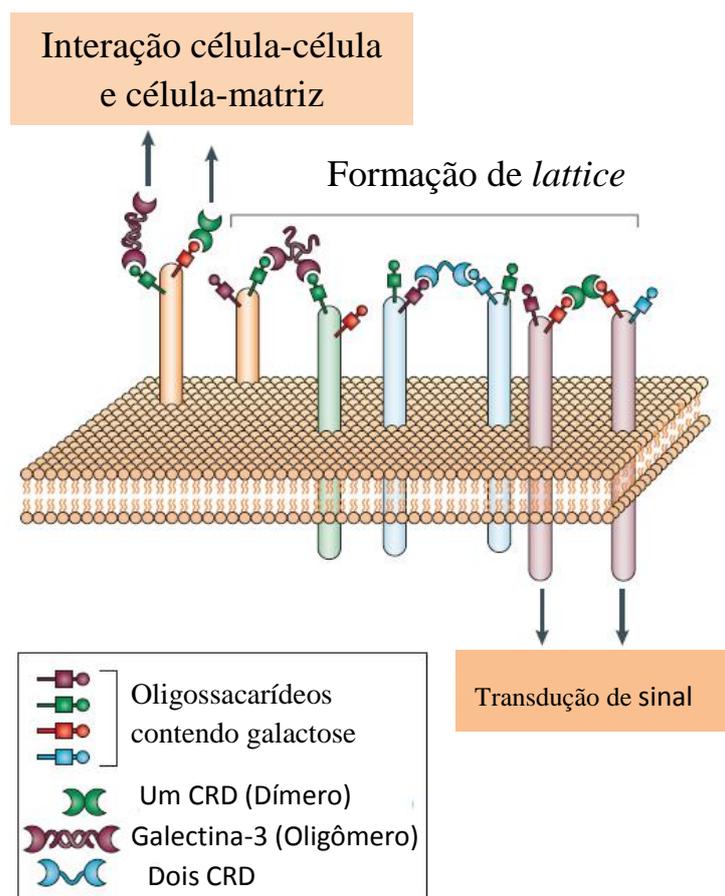


Figura 4. Interação célula-célula e célula-matriz na presença de galectina-3. Adaptado de Liu e Rabinovich, 2005.

Intracelularmente a Gal-3 é encontrada basicamente na sua forma monomérica mas, quando secretada e na presença de ligantes glicosilados para seu domínio de reconhecimento de carboidratos, ela pode se polimerizar através da interação entre seus ligantes N-terminal livres até formar pentâmeros (**Figura 5**). Essa capacidade de se oligomerizar a torna capaz de formar “pontes” entre seus ligantes presentes em glicoconjugados, formando um arranjo na superfície celular denominado *lattice*. Este complexo de interações multivalentes promove o *cross-linking* de glicoproteínas e glicolípídeos, promovendo a formação destes *lattices* organizados de galectinas e glicanos capaz de modular funções celulares (Di Lella *et al*, 2011; Fortuna-Costa *et al.*, 2014; Elola *et al.*, 2015; Nabi, Shankar, Dennis 2015).

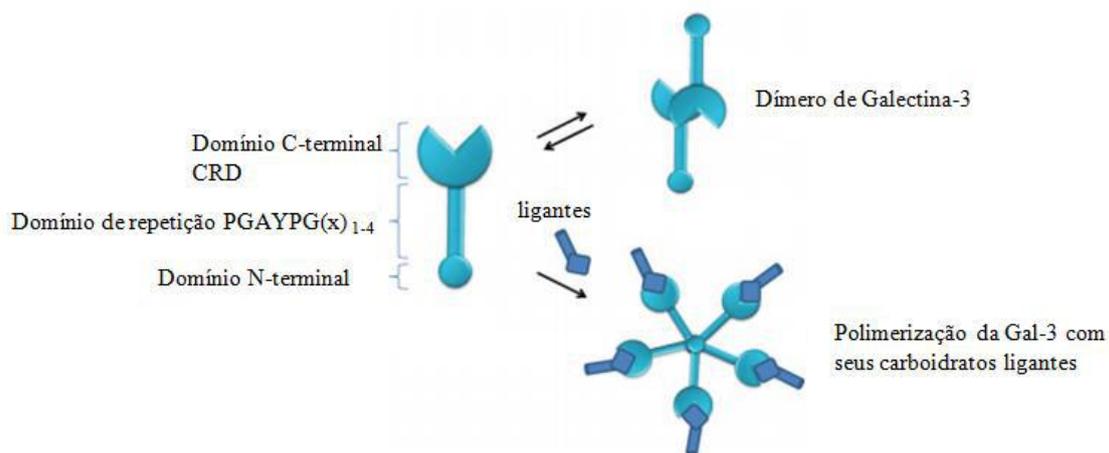


Figura 5. Representação esquemática da estrutura monomérica de galectina-3 e galectina-3 que possui dimerização na região C-terminal na ausência de ligantes e polimerização da região N-terminal na presença de carboidratos ligantes. Adaptado de Newlaczyl e Yu, 2011.

Inúmeras pesquisas vêm descrevendo a relação entre expressão de Gal-3 e a progressão tumoral (Newlaczyl; Yu, 2011). Quando se compara a expressão de galectina-3 em células normais e em câncer de tireoide, por exemplo, pode-se perceber a elevação dos níveis desta lectina. Por outro lado, em casos de tumores relacionados ao sistema reprodutivo é observada uma redução da expressão de Gal-3 durante a progressão da doença (Punt *et al.*, 2015).

1.7 Galectina-3 e o câncer

Ainda existem muitas dúvidas sobre a real função da galectina-3 no câncer (**Tabela 2**). Alguns estudos demonstram que a galectina-3 age como molécula anti-apoptótica enquanto outros como apoptótica. Assim como em alguns tumores, a expressão desta lectina está reduzida sendo associada a aquisição de um fenótipo invasivo e metastático (Castronovo *et al.*, 1996); (Idikio, 1998). Outros estudos não encontram significância na expressão de Gal-3 no prognóstico desta doença (O’driscoll *et al.*, 2003); (Logullo *et al.*, 2007)). Por outro lado, alguns estudos demonstram que o aumento da expressão de galectina-3 possa estar associado a subtipos específicos de câncer (Koo; Jung, 2011).

Tabela 2. Divergentes efeitos da galectina-3 em células cancerígenas em diferentes localizações

| Gal-3 circulante | Gal-3 citoplasmática | Gal-3 na superfície celular | Gal-3 nuclear |
|---------------------------------|---------------------------------|--|-----------------------------------|
| Disseminação | Promoção do crescimento celular | Supressão da imunidade | Regulação da transcrição |
| Adesão de células tumorais | Inibição da apoptose | Promove a angiogênese | Promove o <i>splicing</i> de mRNA |
| Sobrevivência das células | Promoção do ciclo celular | Adesão endotelial das células cancerígenas | Promove apoptose |
| Promoção do crescimento celular | Regulação da transcrição | Adesão das células à matriz | |

Tabela 2. Divergentes efeitos da galectina-3 em células cancerígenas em diferentes localizações. Adaptado de (Newlaczyk; Yu, 2011).

O microambiente do tumor é caracterizado pela presença de glicosilações aberrantes. Essas aberrações são capazes de promover mudanças no nível de expressão da glicosiltransferase no complexo de Golgi de células cancerígenas. Várias evidências apontam para um aumento no tamanho e ramificação de glicanos N-ligados como uma característica do câncer de cólon e mama. Essa mudança usualmente acontece devido a elevada expressão de β -1,6-N-acetiltransferase. (Kyselova *et al.*, 2007)

O estabelecimento de novos vasos capilares é um processo de grande importância para a continuidade do crescimento tumoral, configurando também uma rota de disseminação das células malignas. Nangia-Makker e colaboradores criaram a hipótese de que a Gal-3 secretada pelas células tumorais estaria envolvida na angiogênese. Os autores demonstraram que, *in vitro*, a galectina-3 extracelular afeta o comportamento das células endoteliais através da regulação da formação de tubos capilares de modo dependente do domínio de CRD. Além disso, foi visto que a Gal-3 secretada pelas células tumorais induz a migração de células endoteliais e que, *in vitro*, os tumores apresentam maior densidade de vasos capilares do que os tumores gerados pelas células parentais sem a expressão de Gal-3 (Nangia-Makker *et al.*, 2000).

Alguns autores conferem esse aumento da expressão de Gal-3 a glicosilação que ocorre de forma acentuada em pacientes com câncer. Essa glicosilação aberrante foi descrita pela primeira vez há 45 anos e desde então tem sido demonstrado a ocorrência de mudanças fundamentais no padrão de glicosilação de glicoproteínas secretadas e de superfície celular, que ocorrem durante a transformação maligna e a progressão do câncer (Munkley *et al.*, 2016).

Sabe-se, também, que a expressão de Gal-3, assim como a aquisição do fenótipo maligno, é dependente do tipo de célula em questão (Prasad e Gopalan, 2015). Por isso o modelo para investigar as funções de Gal-3 no câncer devem ser interpretados e avaliados com cautela.

1.8 P-selectina e a inflamação

A inflamação é definida como um mecanismo fisiopatológico em resposta à invasão de um agente infeccioso, ou por uma lesão de origem variada (térmica, química, física ou mecânica), ou até mesmo por uma resposta autoimune, que resulta em reações locais e sistêmicas no organismo. Este processo é formado por vários fenômenos (vasculares, bioquímicos e celulares) que podem se associar e formar uma reação em cascata que envolve uma interação das células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos, plaquetas) e vasculares (endoteliais e células da musculatura lisa). Esse processo tem a finalidade de remover o estímulo indutor e dar início a recuperação tecidual total (Tedgui e Mallat, 2001).

A resposta inicial a um agressor é denominada de fase aguda da inflamação. Entre as características encontradas nessa fase estão a vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular e exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, migração de leucócitos, com predominância de neutrófilos para o foco inflamatório e alteração sistêmicas como dor, febre e elevação nos níveis de determinadas proteínas, que são caracterizadas como proteínas da fase aguda, como o fibrinogênio (Bauhmann; Gaudie, 1994).

A migração de leucócitos para o local da inflamação ocorre em função da interação destes com as células endoteliais, através de proteínas adesivas em sua superfície, chamadas de moléculas de adesão. Esta fase é intermediada por diferentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos, os quais levam a um aumento da interação entre neutrófilos e células do endotélio, o que facilita a migração dos neutrófilos a favor de um gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório (Mcever, 1992; Huttenlocher et al., 1995)(**Figura 6**).

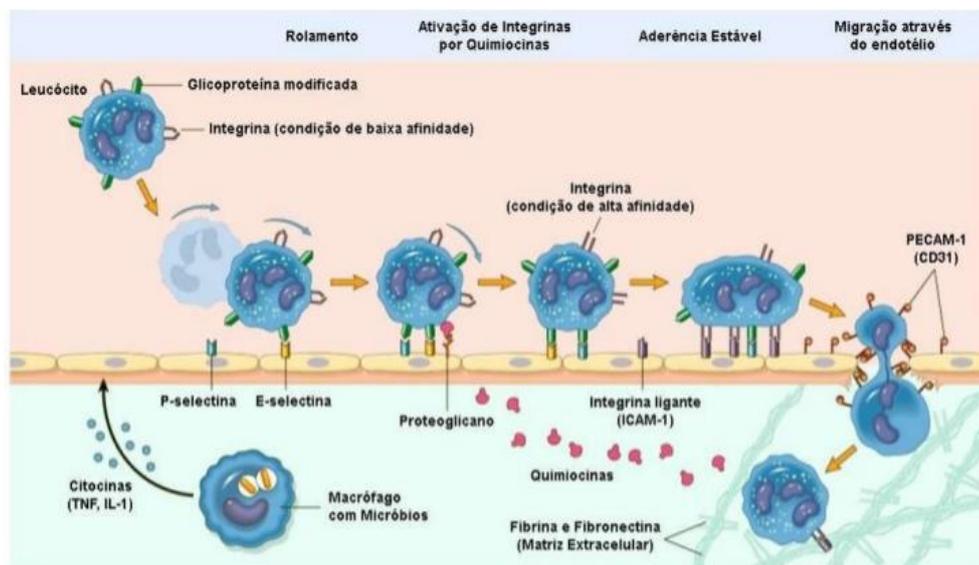


Figura 6. Estágios do processo de inflamação aguda. As etapas consistem em: Rolamento dos leucócitos, ativação das integrinas, aderência estável com posterior migração através do endotélio. Adaptado de: Elsevier, Kumar *et al.* Disponível em: studentconsult.com

As selectinas estão presentes em leucócitos, células endoteliais e plaquetas. Elas são capazes de se ligar a moléculas glicosiladas que estão presentes na superfície de outras células e, em geral, medeiam adesão de baixa afinidade entre os leucócitos e endotélio. Mesmo essas interações sendo fracas e reversíveis, elas são suficientes para

determinar a desaceleração e rolamento de leucócitos no endotélio vascular (Rankin, 2004).

O primeiro contato entre o neutrófilo e o endotélio ativado é mediado pela interação das selectinas -P e -E no endotélio e a mucina presente na superfície. Concomitantemente, a L-selectina, que é expressa constitutivamente nos neutrófilos, liga-se ao conjunto de mucinas na superfície do endotélio. Essas ligações formadas são de rápida dissociação permitindo que os neutrófilos rolem na parede do vaso impelidos pelo fluxo do vaso sanguíneo sendo expostos a componentes quimiotáticos como: fibrina; fatores solúveis plaquetários; mediadores de mastócitos, entre outros (Carlos e Harlan, 1994)

A presença destas quimiocinas induz alterações de outras adesinas na superfície dos leucócitos, as integrinas. Esse reconhecimento é de maior avidéz aos ligantes expressos no endotélio, o que leva a imobilização de neutrófilos e promove sua firme aderência à parede do vaso. Logo após a aderência ao endotélio, é iniciado o processo de transmigração através do vaso (Smith, 2008; Weber et al., 2007) envolvendo a participação de moléculas juncionais (Petri; Bixel, 2006). Os leucócitos emitem pseudópodes entre as células endoteliais, conseguindo atravessar a membrana basal migrando para o espaço intersticial, em direção ao foco da lesão. Este processo é dirigido por gradiente de quimiocinas e facilitado pela interação das integrinas aos componentes da matriz extracelular (Cronstein e Weissman, 1993).

Diante disto, perguntamos se as galactanas purificadas nesse trabalho seriam capazes de interagir com a P-selectina expressa pelas células endoteliais impedindo assim a ligação das células inflamatórias e diminuindo a inflamação aguda.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O número de pessoas com câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo (Maximiliano e Cláudia Vitória, 2005).

Apesar de nos últimos anos ter havido melhora na detecção precoce e no tratamento do câncer, a doença metastática, que resulta do espalhamento das células tumorais para outras partes do corpo, é a principal causa de morte de pacientes com esta patologia (World Health Organization, 2008). Este processo ainda é pouco entendido e frequentemente não pode ser tratado devido a inexistência de terapias específicas para controlar ou bloquear a metástase (Hait, 2010). Portanto, se faz necessário uma melhor compreensão acerca dos mecanismos celulares e moleculares que estão envolvidos no processo metastático.

Inúmeras evidências apontam para um relevante papel da galectina-3 extracelular em etapas essenciais na progressão tumoral e da metástase. Devido a este fato, a Gal-3 tem sido explorada como um alvo terapêutico (Fortuna-costa *et al.*, 2014).

Nosso laboratório já demonstrou o potencial anti-metastático de análogos de heparina que foram isolados de invertebrados marinhos (Gomes *et al.*, 2015). Estes glicanos atuam impedindo a formação de complexos entre células tumorais e plaquetas na circulação. Isso ocorre devido à inibição da interação entre a P-selectina da plaqueta ativada com os oligossacarídeos das células tumorais e essa inibição também faz com que ela não seja capaz de iniciar o rolamento dos leucócitos, diminuindo assim o infiltrado inflamatório no sítio da inflamação aguda (Teixeira, 2013)

Diante disto, investigamos se os análogos da heparina com os quais temos trabalhado no laboratório poderiam diminuir os efeitos causados pela Gal-3 extracelular na indução da migração de células cancerígenas e se possuem a capacidade de inibir a P-selectina atenuando assim o processo de inflamação aguda.

3. OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliar, *in vitro*, a atividade das galactanas sulfatadas isoladas do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e da ascídia *Styela plicata* na inibição da migração de células MDA-MB-231 promovida pela galectina-3 extracelular e *in vivo* os efeitos anti-inflamatórios da galactana do *E.lucunter* em um modelo de inflamação aguda dependente de P-selectina.

3.1 Objetivos específicos

Extrair e isolar os polissacarídeos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e da ascídia *Styela plicata*;

Avaliar *in vitro* os efeitos das galactanas sulfatadas na migração celular em sistema *transwell* da linhagem humana MDA-MB-231 induzida pela galectina-3 extracelular;

Testar *in vivo* o efeito da galactana do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* na inflamação aguda induzida por tioglicolato.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e coleta dos materiais

4.1.2 *Echinometra lucunter* e *Styela plicata*

O ouriço da espécie *Echinometra lucunter* e a ascídia *Styela plicata* foram coletados por mergulho livre na praia da Urca, Baía de Guanabara, cidade do Rio de Janeiro.

4.2 Extração dos polissacarídeos do ouriço-do-mar

A extração dos polissacarídeos foi realizada através do isolamento dos gametas do ouriço-do-mar por injeção intracelômica de KCl 0,5 M (\approx 5mL/por indivíduo). O ouriço foi mantido com a porção dorsal do corpo para baixo, sobre uma placa de petri, com a finalidade de retirar os gametas. Os ovócitos foram identificados por apresentarem uma cor amarelada.

Depois de retirados, os ovócitos foram lavados com água do mar artificial sem cálcio e com 10 mM de EDTA, em pH 8. Esse material foi mantido em banho de gelo, onde o pH foi ajustado para 5 com 0,1M HCl, permanecendo nesse pH por 5 minutos e depois ajustado novamente para 8, com adição de NaOH. Ao final desse processo o material foi centrifugado durante trinta minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi dializado com água destilada durante 48h e posteriormente liofilizado com a finalidade de retirar toda água da amostra.

O processo de digestão foi iniciado com a pesagem do gel bruto seco derivado da extração. O tecido foi hidratado em 300 μ l de tampão de digestão durante 24h a 4°C, composto por 100 mM de acetato de sódio anidro, 5 mM de EDTA bissódico e 5mM de cisteína, em pH 5.

4.3 Extração dos polissacarídeos da ascídia

O protocolo utilizado foi descrito por Albano e Mourão em 1986. Primeiramente realizamos a separação da túnica e vísceras das ascídias. As túnicas foram limpas e

armazenadas em um béquer contendo álcool, tendo realizado três trocas em um intervalo de 24h, para a retirada de impurezas e lipídeos.

O tampão de digestão foi preparado contendo água destilada contendo 0,5 M acetato de sódio anidro; 0,03M EDTA; 0,02M cisteína, pH para 5,0.

Os polissacarídeos totais foram extraídos da túnica por digestão proteolítica com papaína, em uma concentração correspondente a 10% do volume da amostra. Cada digestão foi feita em banho-maria a 60°C durante 24h., sendo o tampão trocado três vezes em intervalos de 24h. A papaína foi adicionada ao tampão a cada troca.

Após 72h do processo de digestão proteolítica, realizamos a centrifugação do material dos três dias, sendo o sobrenadante guardado e a solução remanescente descartada. Após este processo foi adicionado um volume de etanol absoluto correspondente a três vezes o volume do material centrifugado e este foi armazenado a -20°C durante 24h.

Após 24h centrifugamos o material, descartamos o sobrenadante e o pellet contendo o extrato bruto foi armazenado em estufa a 60 °C até que o álcool fosse totalmente evaporado.

4.4 Purificação dos polissacarídeos

4.4.1 *Echinometra lucunter*

Os extratos brutos de polissacarídeos (\approx 100mg) das matrizes gelatinosas dos óvulos dos ouriços-do-mar foram aplicados em uma coluna de troca iônica DEAE celulose, equilibrada com tampão de 5 mM acetato de sódio, pH 5, segundo protocolo descrito por Cardoso, L.E.M em 1994.

Para a eluição dos polissacarídeos da coluna foi realizado um gradiente crescente de 0 a 3M de NaCl em um tampão acetato de sódio, pH 5. O fluxo da coluna foi de 12mL/h durante o qual foram coletadas frações que foram testadas por metacromasia. Ao fim da cromatografia obtivemos um rendimento de 44,2mg da galactana.

O monitoramento das frações foi realizada através do teste da dosagem de hexose (método de Dubois). As frações que foram identificadas através destes testes contendo α -Lgalactana sulfatada (*E. lucunter*) foram agrupadas, dialisadas em água destilada e posteriormente liofilizadas.

4.4.2 *Styela plicata*

Os extratos dos polissacarídeos da túnica da ascídia foram aplicados em uma coluna de exclusão por tamanho, Superose 12, sendo equilibrada com acetato de sódio e eluída em um tampão com 3M de NaCl, 0,02M de Tris e 1M de EDTA em um pH 6. Ao fim deste processo obtivemos um rendimento de 1,03 mg.

O tempo de eluição foi de 50 minutos e as frações coletadas testadas por metacromasia para verificar a presença de polissacarídeos. As frações que foram identificadas através deste teste como contendo α -galactana sulfatada (*S.plicata*) foram agrupadas, dialisadas e liofilizadas.

4.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os polissacarídeos previamente purificados através da cromatografia foram analisados por eletroforese em gel de agarose, como descrito por Dietrich e Dietrich, em 1976. Para isso utilizamos volumes de cada amostra correspondente ao mínimo necessário para um resultado positivo no teste de metacromasia. Estas amostras foram aplicadas em um gel 0,5% de agarose, em tampão 50 mM de 1,3-diaminopropano/ácido acético, pH 9, sendo submetido a um campo elétrico com intensidade de 110V, por aproximadamente 1h.

Ao término da eletroforese, as amostras foram precipitadas no gel em uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio, 0,1% (cetavlon), onde ocorreu a precipitação dos polissacarídeos na malha do gel, permanecendo nesta solução até o dia seguinte. Posteriormente o gel foi seco sob calor e corado em azul de toluidina 0,1% e descorado em uma solução de ácido acético:etanol:água (0,1:5:5, v/v).

4.5 Cultura de células

Para os experimentos *in vitro* foram utilizadas células da linhagem MDA-MB-231 crescidas em monocamadas em garrafas, utilizando-se meio de cultura DMEM alta glicose com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C e 5% de CO².

A passagem das células foi realizada a cada três ou quatro dias seguindo o seguinte procedimento: o meio é desprezado e a monocamada de células lavada com

PBS. É adicionada **tripsina** , esperamos por 5 minutos para que as células não estejam mais aderidas ao fundo da garrafa, com isso elas são suspensas em meio de cultura e repassadas para novas garrafas.

4.6 Os animais

Os animais utilizados no experimento de inflamação foram camundongos da linhagem C57/BL6. Os protocolos experimentais com animais de laboratório utilizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética com animais em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.7 Migração em sistema de *transwell*

Esse ensaio foi realizado em insertos com poros de 8µm em uma placa de 24 poços, utilizando uma concentração de 10⁵ células de câncer de mama humano MDA-MB-231 por inserto. Na parte superior de cada inserto foram adicionadas as seis diferentes condições (controle negativo, controle positivo, controle de tratamento e as três diferentes concentrações da galactana sulfatada do *E. lucunter* ou da *S. plicata*) em meio DMEM alta glicose, na ausência de soro fetal bovino (SFB) e na parte inferior 650µl de meio DMEM alta glicose com 10% SFB (**Figura 7**). No controle negativo e no controle positivo as células permaneceram na ausência ou presença de 4µg/mL de galectina-3, respectivamente. No controle de tratamento as células permaneceram na presença de 10µg/mL da respectiva galactana sulfatada. As três condições experimentais consistiam em uma concentração fixa de 4µg/mL de galectina-3, e as galactanas sulfatadas nas concentrações de 10µg/ml, 1µg/mL e 0,1µg/mL.

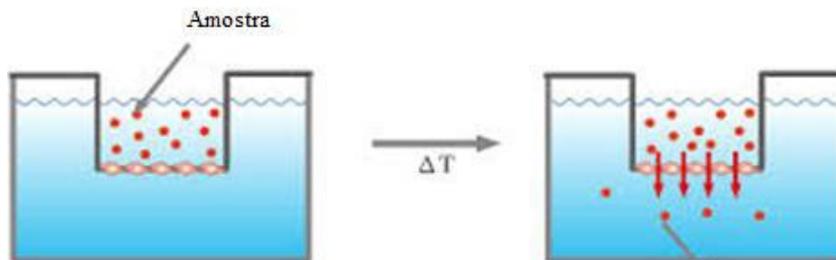


Figura 7. Imagem demonstrativa do ensaio em sistema *transwell*. Na parte superior são adicionadas as amostras e as células em meio sem soro e na parte inferior meio com soro, levando a formação de um gradiente de quimioatração. Disponível em: pharmacocell.co.jp/en/products/bbbtest_e.html

Após seis horas de migração as células que não migraram foram removidas da parte superior do inserto com um cotonete molhado com PBS e as células que permaneceram no inserto foram fixadas com metanol. As membranas foram coradas com solução de cristal violeta 1% para que pudéssemos fotografar e quantificar o número de células que migraram através do software Image J.

4.8 Modelo de peritonite aguda

Camundongos machos C57/BL6 de 8 a 10 semanas receberam injeção pela veia da cauda de 100 μ g da galactana sulfatada de *E.lucunter*, diluída em 100 μ L de PBS, ou 100 μ L de PBS somente. Após 15 minutos, eles receberam injeção intraperitoneal de 1mL de uma solução estéril de meio tioglicolato, 4% diluída em PBS. Após 3 horas os camundongos foram sacrificados e as células presentes na cavidade peritoneal do animal recolhidas por lavagem com 8mL de PBS. O material da lavagem foi centrifugado por *cytospin* (900 RPM por 5 minutos) e corado com *Wright Stain*. Após este processo, foi realizada a contagem diferencial de leucócitos polimorfonucleares (PMN).

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento da galactana sulfatada do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*

Os polissacarídeos extraídos da membrana gelatinosa que recobre os óvulos dos ouriços foram purificados em uma coluna de troca iônica DEAE-celulose e submetidos ao teste de metacromasia onde conseguimos identificar a presença de diversos picos de absorvância. Verificamos também a condutividade de cada fração com a finalidade de estimar a molaridade do tampão. Porém, já é conhecido pela literatura que a galactana sulfatada dos óvulos do *Echinometra locunter* é o segundo composto a ser eluído na purificação por este método. Diante disto, descartamos as demais frações e coletamos apenas as referentes ao segundo pico.

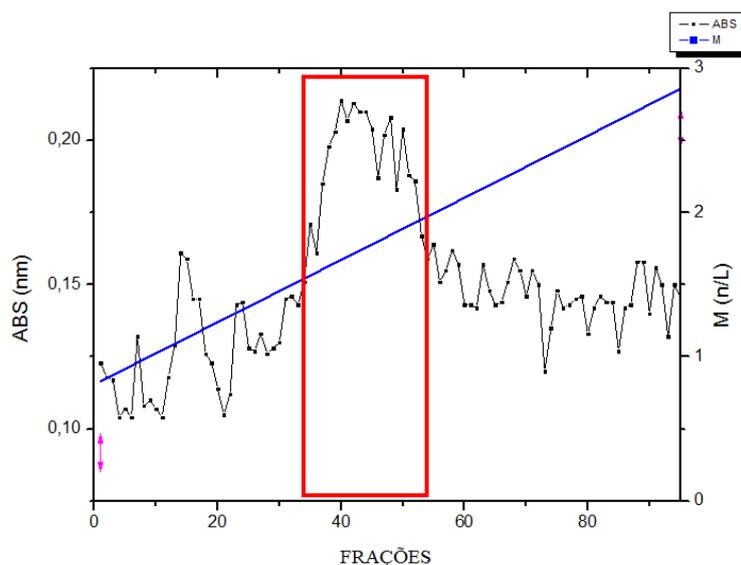


Figura 8. Extração da galactana sulfatada do *E. lucunter*. O cromatograma representa uma das passagens pela coluna DEAE-celulose e demonstra a absorvância a 525nm das frações coletadas em função da molaridade do tampão de eluição para cada fração por onde se passou o produto da extração. As frações coletadas estão em destaque na figura.

Essas frações foram dialisadas e liofilizadas. Ressuspendemos o material seco na concentração desejada e realizamos uma eletroforese em gel de agarose com a finalidade de observar se as frações escolhidas tinham sido de fato purificadas. No gel podemos observar que as quatro bandas referentes às frações estão na mesma altura que

o controle, permitindo inferir que o material proveniente do ouriço-do-mar realmente foi purificado.

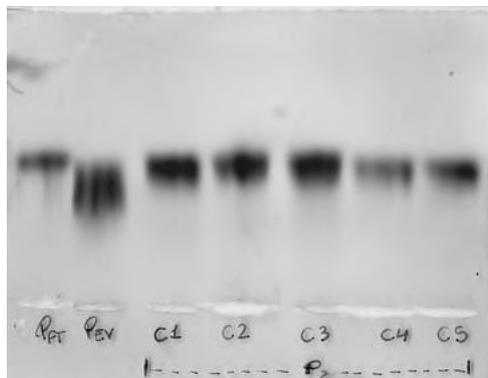


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose do pico dois das diferentes passagens pela coluna DEAE celulose. Pft (padrão de galactana); P(ev) padrão antigo de galactana; C1,C2,C3,C4 e C5 são referentes ao pico dois de cada passagem na coluna de DEAE celulose.

5.2 Isolamento das galactanas sulfatadas da ascídia *Styela plicata*

Os polissacarídeos extraídos da ascídia com papaína foram purificados através da cromatografia de exclusão de tamanho numa coluna Sepharose 12, onde foram obtidas diferentes frações. Já foi demonstrado que através da extração podemos obter três picos diferentes (Pavão MSG e Albano M, 1986), com três compostos de diferentes pesos moleculares onde a galactana é a primeira a ser eluída da coluna, já que ela possui um peso molecular de 100.000 Da enquanto os outros compostos 20.000 Da e 8.000 Da.

As diferentes frações foram submetidas ao teste de metacromasia com DMB, onde pudemos confirmar a presença dos picos descritos na literatura e outros que não foram descritos. As frações referentes aos menores e últimos picos foram descartadas.

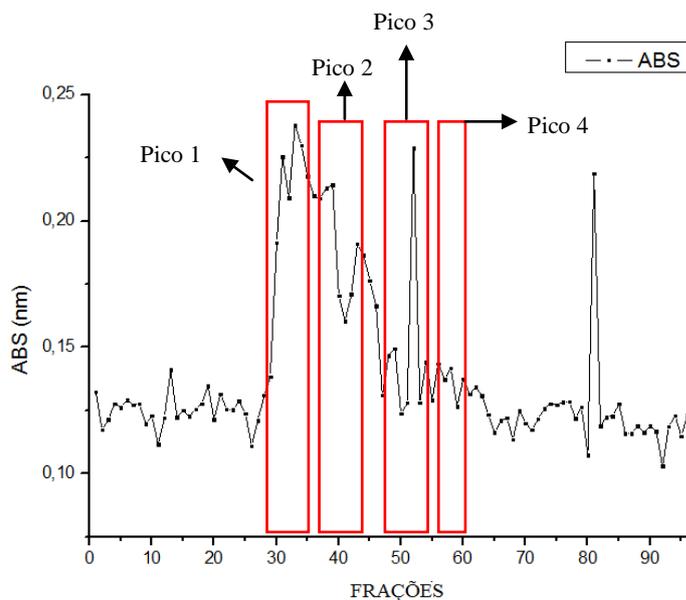


Figura 10. Extração da galactana sulfatada da ascídia *Styela plicata*. O cromatograma representa a absorbância a 525nm medido por metacromasia das frações coletadas utilizando a coluna de superose 12, por onde se passou o produto da extração obtido da ascídia *Styela plicata*. As frações coletadas estão em destaque na figura.

Através desse gráfico escolhemos as frações 27 a 34 (pico 1); 36 a 44 (pico 2) 48 a 55 (pico 3) e 57 a 61 (pico 4). Estas frações foram dialisadas e liofilizadas. Fizemos um gel de agarose para verificar se a purificação da amostra realmente havia acontecido. A concentração aplicada no gel foi referente ao teste de metacromasia, onde colocávamos 50 μ l de DMB em uma concentração crescente da galactana e observávamos em qual concentração ocorria a mudança de cor do DMB, esta concentração era aplicada no gel.

No gel podemos observar que as quatro bandas referentes às frações estão na mesma altura que o nosso controle, o que nos permite inferir que o material proveniente da ascídia foi purificado.

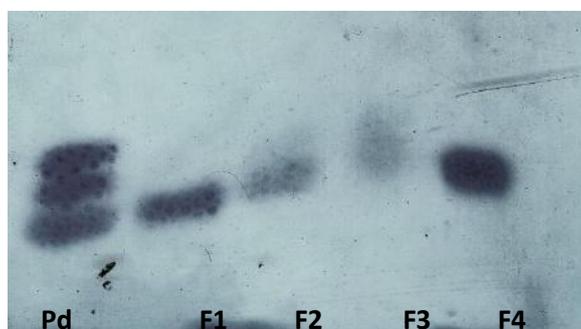


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose dos picos coletados na cromatografia de exclusão por tamanho. Onde Pd é padrão de polissacarídeos; F1, F2, F3, F4 são as frações obtidas na cromatografia .

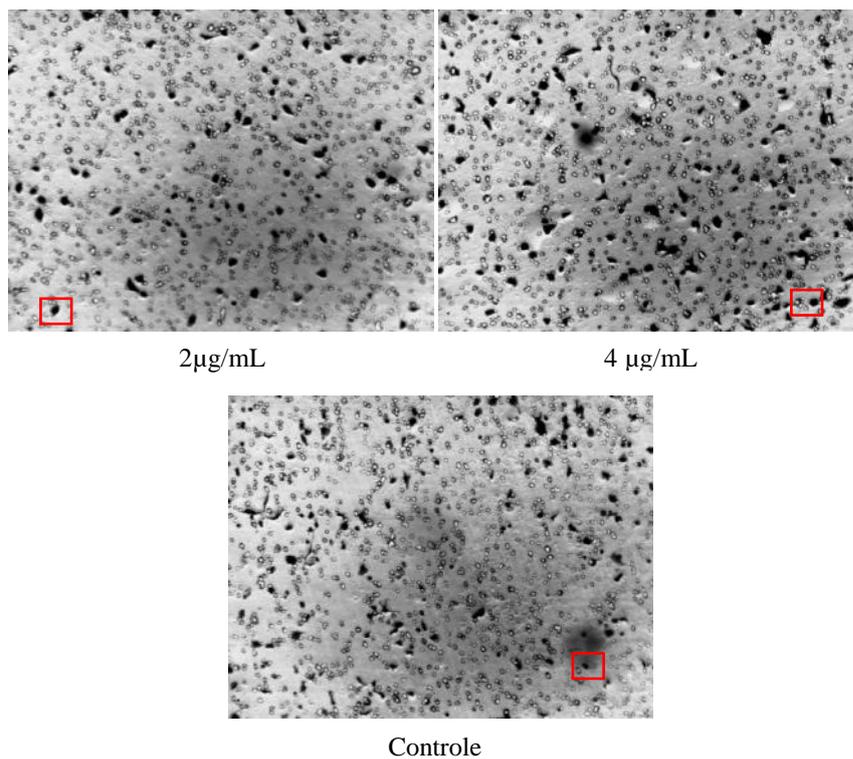
5.3 Galectina-3 extracelular promove a migração das células MDA-MB 231

Para dar início aos ensaios *in vitro* com os polissacarídeos e a Gal-3, realizamos um experimento piloto com a finalidade de definir uma concentração eficaz para os experimentos a serem realizados com a galectina-3.

Nesse experimento foram utilizadas três condições: controle negativo, 2µg/mL e 4µg/mL. As duas concentrações de 2µg/mL e 4µg/mL foram escolhidas pois dados anteriores obtidos por nosso grupo demonstraram que essas concentrações levavam a um nível significativo de migração.

O papel da Gal-3 extracelular na migração nestas condições foi investigado através do ensaio de migração em sistema *transwell*. As células migraram na presença ou ausência das diferentes concentrações de Gal-3, adicionadas ao compartimento superior do inserto de *transwell*.

A



B

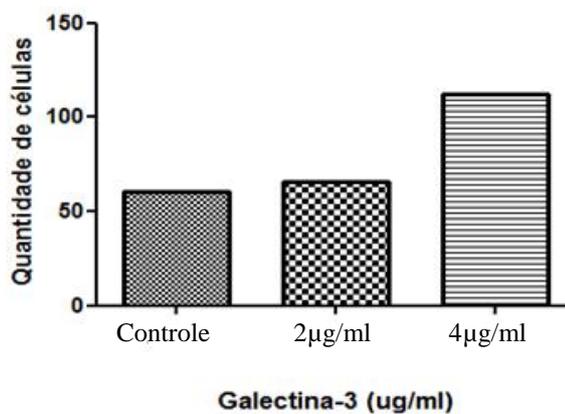


Figura 12. Testes de concentração de Galectina-3. Efeito da galectina-3 na migração de células de câncer de mama MDA-MB-231 por ensaio de *transwell*. A) Imagens representativas de cada condição. As células utilizadas como referência para a contagem estão em destaque na imagem. B) Quantificação de células que migraram para a superfície inferior da membrana do sistema de *transwell* sob tratamento com galectina-3 em três concentrações diferentes. Experimento realizado em duplicata. (n=1).

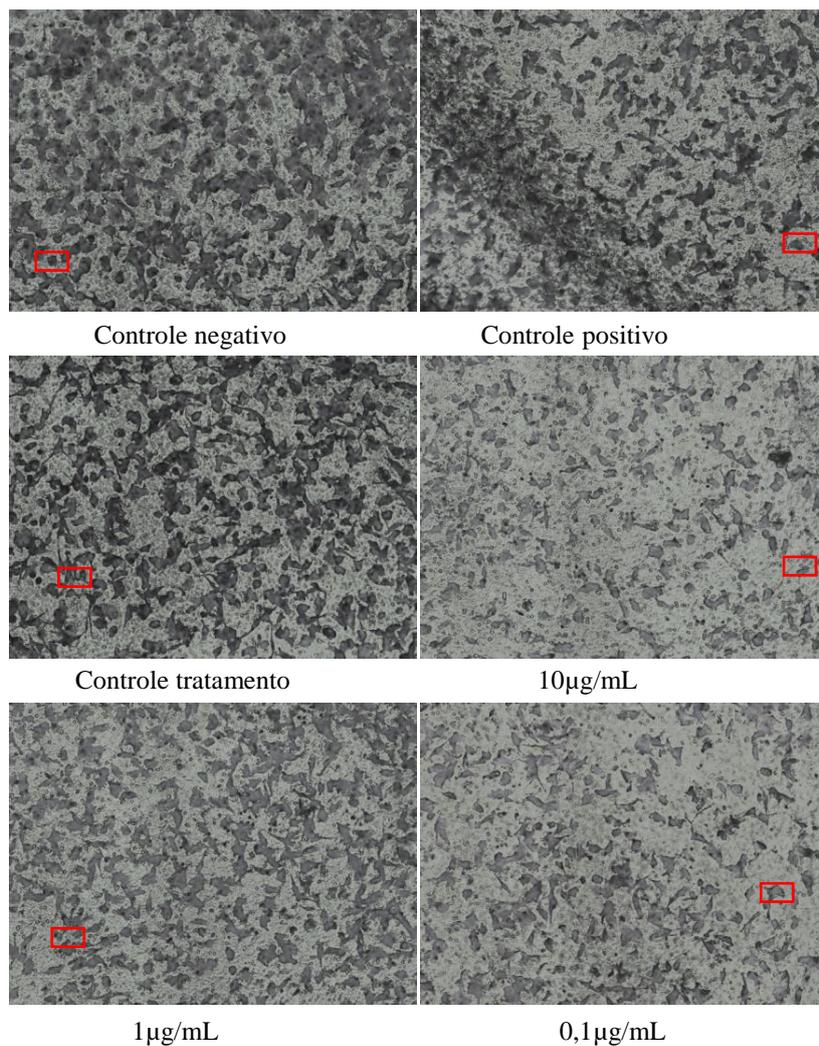
5.4 Ensaio de migração em sistema *transwell*

Tanto o efeito anticoagulante quanto o efeito anti-metastático de polissacarídeos sulfatados podem ser encontrados em diversos trabalhos na literatura. O potencial anti-inflamatório destes compostos está relacionado à ação em diversos pontos durante o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. Porém entre os mais importantes estão a inibição da ligação das selectinas nas células endoteliais, reduzindo o rolamento de leucócitos (Cumashi *et al.*, 2007; Proudfoot, 2006).

Os potenciais anticoagulante e antitrombótico das galactanas são, com certeza, os mais bem estudados. Isso ocorre devido ao fato da necessidade do desenvolvimento de novos fármacos em função do aumento da incidência de doenças relacionadas ao sangue e ao coração.

Diante disto resolvemos estudar os efeitos da galactana do *Echinometra lucunter* frente à migração celular mediada por galectina-3 extracelular. Para isso utilizamos células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 na concentração de 1×10^5 células e $4 \mu\text{g/mL}$ de galectina-3 num experimento de migração por 6 horas

A



B

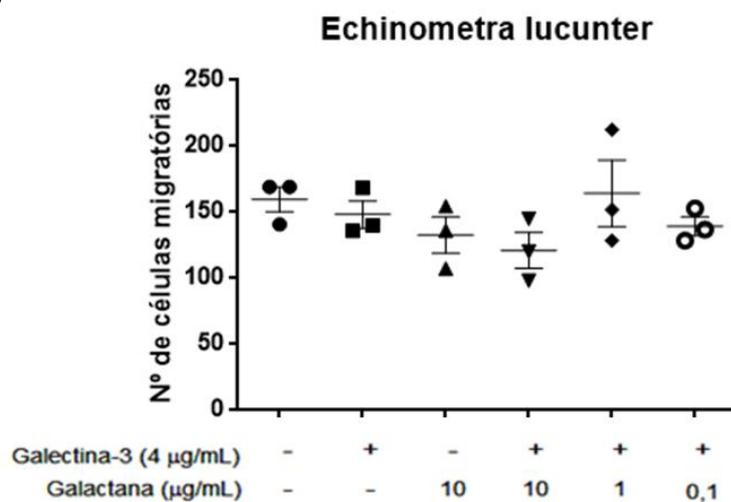


Figura 13. Experimento de migração em sistema *transwell*. A) Imagens representativas de cada condição. As células utilizadas como referência para a contagem estão em destaque na imagem. B) Quantificação de células que migraram após 6 horas para a superfície inferior da membrana do sistema de *transwell* na presença ou ausência de galectina-3 e galactana do *Echinometra lucunter* em três concentrações diferentes como descrito nos materiais e métodos. Experimento realizado em duplicata. (n=3)

O gráfico mostra a porcentagem de células migrantes em relação ao controle negativo, onde cada símbolo faz referência a um dia de experimento, visto que o mesmo foi realizado três vezes. As condições foram as mesmas utilizadas no experimento do *E. lucunter*.

Observando o gráfico podemos verificar uma redução da migração celular após o tratamento com galactana na concentração de 10µg/mL e 0,1µg/mL e um aumento na concentração de 1µg/mL. Utilizamos o programa *GraphPad Prism* para verificar se o resultado obtido possuía significância estatística e observamos a ausência de significância.

Podemos observar também que o controle positivo obteve uma porcentagem de migração bem similar ao controle negativo, assim como o controle de tratamento.

5.5 Ensaio de migração em sistema *transwell* da galactana da *Styela plicata*

Trabalhos já foram realizados demonstrando a ação dos polissacarídeos da *Styela plicata* no câncer (Lee *et al.*, 2007). Diante disso realizamos ensaios de migração em sistema *transwell* para poder comparar o resultado das duas galactanas utilizadas no trabalho.

O gráfico mostra a porcentagem de células migrantes em relação ao controle negativo, onde cada símbolo faz referência a um dia de experimento, visto que o mesmo foi realizado três vezes. Observando o gráfico podemos verificar uma redução da migração celular após o tratamento com galactana na concentração de 10µg/mL e um aumento na concentração de 1µg/mL e 0,1 µg/mL. Porém esse resultado não mostrou significância quando comparado ao controle.

Podemos observar também que o controle positivo obteve uma porcentagem de migração bem similar ao controle negativo, assim como o controle de tratamento.

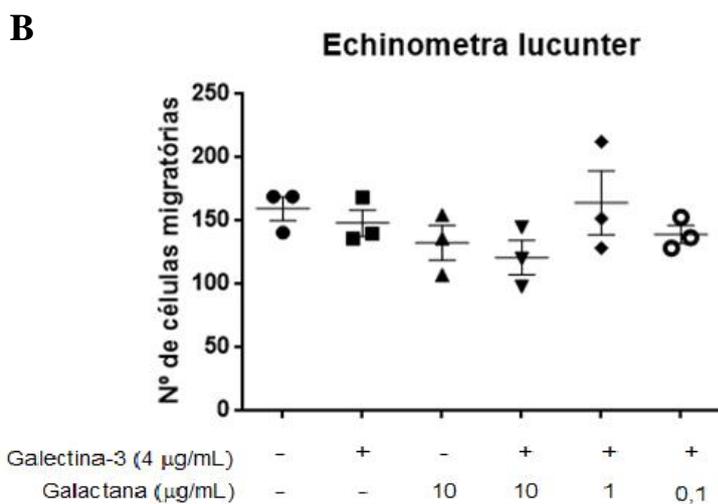
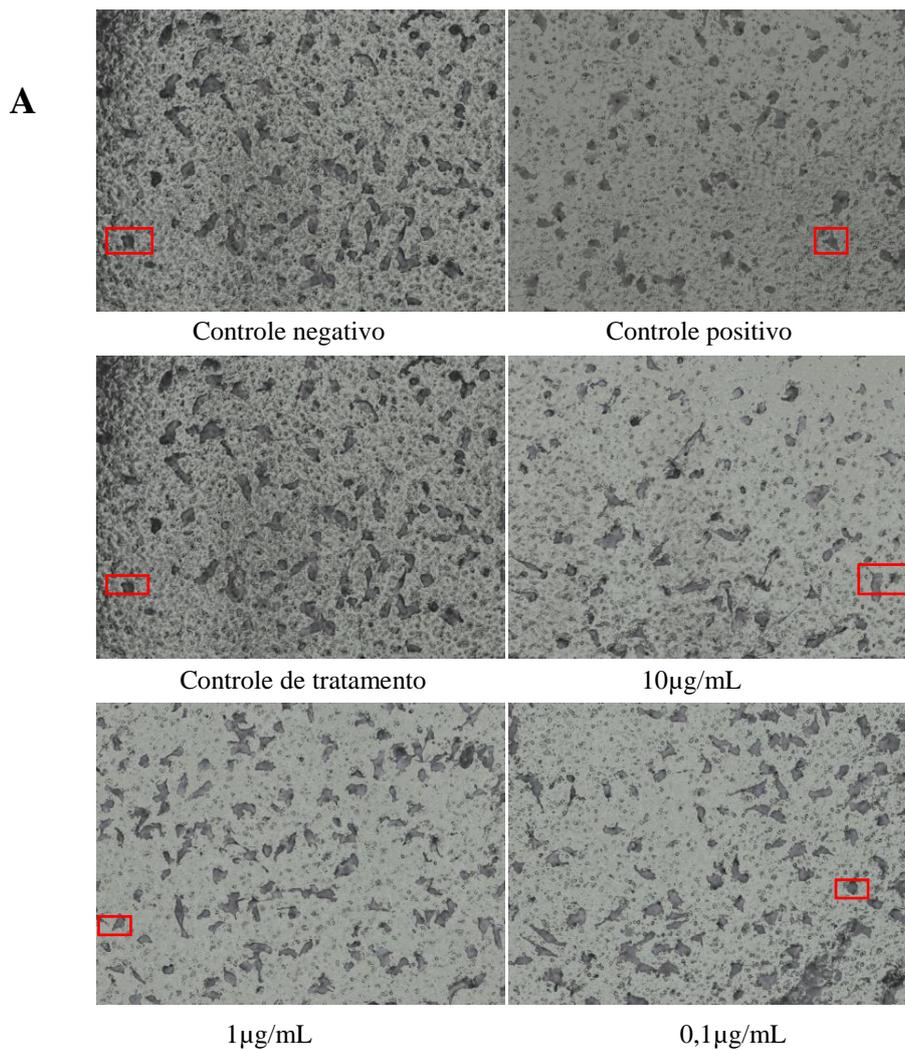


Figura 14. Experimento de migração. Efeito da galectina-3 na migração de células de câncer de mama MDA-MB-231 por ensaio de *transwell*. A) Imagens representativas de cada condição. B) Quantificação de células que migraram para a superfície inferior da membrana do sistema de *transwell* na presença ou ausência de galectina-3 e galactana da *Styela plicata* em três concentrações diferentes como descrito nos materiais e métodos. Experimento realizado em duplicata. (n=3)

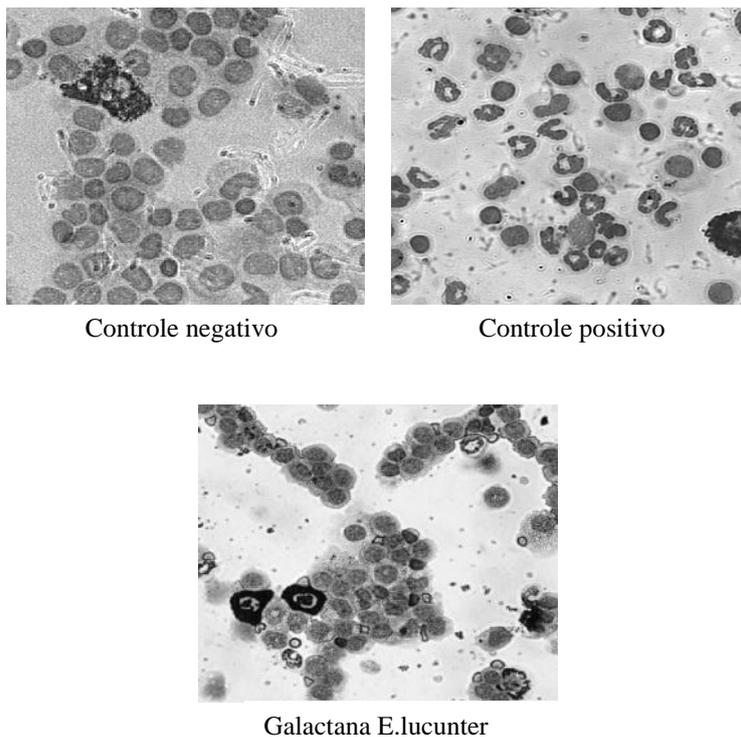
5.6 Ensaio de peritonite aguda induzida por tioglicolato

Além da ação antimetastática, grande parte dos polissacarídeos sulfatados apresenta outras funções como antitrombótica, anticoagulante e anti-inflamatória. Na inflamação aguda a P-selectina é expressa no endotélio ativado dos vasos sanguíneos que irrigam a região inflamada atuando no rolamento dos leucócitos no endotélio, fazendo com eles diminuam a sua velocidade e assim possam extravasar do vaso e chegar até o tecido.

Quando a P-selectina está inibida ela não é capaz de iniciar o rolamento dos leucócitos, o que atenua o infiltrado inflamatório no sítio da inflamação aguda.

O tioglicolato 4% foi injetado intraperitonealmente em camundongos C57/BL6, após a injeção de 100ug da galactana do *E. lucunter* ou PBS na veia da cauda. Os lavados peritoneais foram recolhidos após 3 horas e, observou-se que essa galactana é capaz de inibir significativamente a infiltração de leucócitos polimorfonucleares para o sítio da inflamação.

A



B

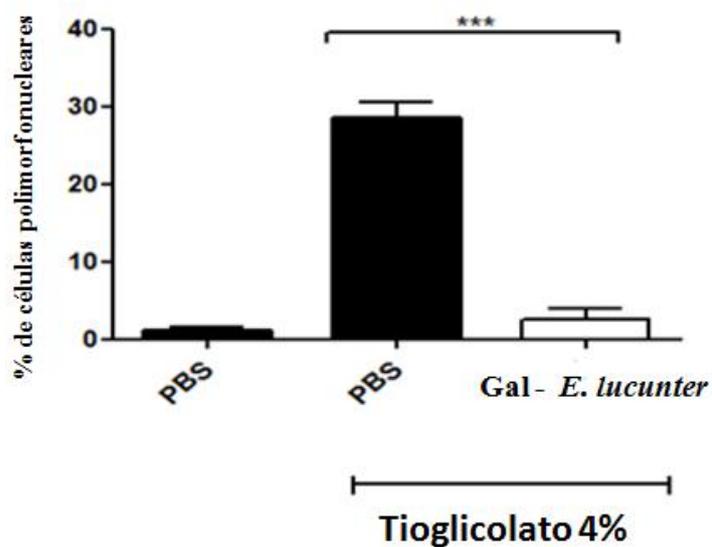


Figura 15. Peritonite aguda induzida por tioglicolato. Em (A) imagens do ensaio de peritonite aguda onde no controle negativo foi injetado apenas PB; controle positivo foi injetado PBS mais tioglicolato 4% e no controle de tratamento foi injetado a galactana do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* mais tioglicolato 4%, como descrito nos materiais e métodos. Em (B) quantificação da contagem de leucócitos polimorfonucleares (n=3).

6 DISCUSSÃO

Sabemos que a metástase é um processo altamente controlado onde as células tumorais precisam ultrapassar diversas barreiras para conseguirem sobreviver e se espalhar pelo organismo. Apesar da metástase acometer pelo menos 90% dos pacientes que morrem com câncer, este não é um processo fácil de se estabelecer (Valastyan e Weinberg, 2011).

Diversos polissacarídeos já foram descritos como inibidores de selectinas, tendo assim tanto efeitos antimetastáticos como efeitos anti-inflamatórios (Borsig *et al.*, 2007a; Kozłowski *et al.*, 2011; Melo-Filho *et al.*, 2010). Por possuírem essas aplicações eles são estudados com a perspectiva do desenvolvimento de novas drogas que possam ser utilizadas no mercado, principalmente em substituição à heparina. O problema da heparina está no fato dela ser extraída de uma fonte limitada (intestino de porco e pulmão de boi), e por ela ser extraída de mamíferos, há uma maior possibilidade da transmissão de algum patógeno ou de algum contaminante que também seja nocivo ao ser humano (Aquino *et al.*, 2010).

Devido a todas estas limitações da heparina, já se vem, há algum tempo, estudando outras fontes de polissacarídeos sulfatados. As principais fontes alternativas de obtenção desses polissacarídeos em nosso laboratório são os organismos marinhos, como algas e invertebrados.

Nós utilizamos nesse trabalho o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e a ascídia *Styela plicata*. Extraímos destes dois invertebrados açúcares chamados de galactanas sulfatadas. Estes açúcares possuem diferenças entre si, principalmente nas ramificações. A galactana do ouriço-do-mar é isolada do *egg jelly* (a matriz gelatinosa que recobre os óvulos). Já na ascídia, ela é isolada da túnica.

Como a sulfatação é um fator importante nas ligações entre carboidratos e galectinas (Carlow *et al.*, 2009), decidimos realizar um experimento onde pudéssemos comparar a ação dos polissacarídeos na migração celular promovida pela galectina-3, que é uma lectina reconhecida por atuar na progressão tumoral, tornando o câncer, algumas vezes, mais invasivo.

Escolhemos o ensaio de migração em sistema *transwell* pois no primeiro momento imaginamos ser o que mais se adequaria à nossa pergunta. Para isso

realizamos um experimento piloto para definir a concentração de galectina-3 mais adequada para usar nos experimentos, chegando à conclusão que a melhor seria 4µg/mL.

O ensaio foi realizado utilizando diluições seriadas das galactanas para que pudéssemos observar a concentração ótima de atuação da mesma. Ao quantificar o número de células migrantes com o tratamento com a galactana sulfatada do *Echinometra lucunter*, chegamos a conclusão que não houve uma diferença significativa na porcentagem de migração em relação ao controle, mas podemos observar também uma tendência de migração diferente da imaginada. Apesar das diferenças não serem significativas, na concentração de 1µg/mL houve um aumento na quantidade de células migrantes quando comparamos a concentração de 0,1µg/mL, o que sugere que a galactana talvez tenha uma concentração ótima de atuação e que 10µg possa ser uma concentração muito elevada da galactana, possivelmente levando as células a morte (**figura 11**). Nós realizamos o ensaio de MTT com a finalidade de verificar a citotoxicidade das galactanas, porém o resultado foi inconclusivo e optamos por não incluir nessa monografia.

Quando observamos a quantificação das células migrantes que foram tratadas com a galactana da *Styela plicata*, podemos perceber um comportamento similar nas concentrações de 1µg/mL, 0,1µg/mL e o controle positivo (tratamento com a Gal3), sugerindo assim que essas duas concentrações utilizadas não são as melhores faixas de atuação da galactana.

Taiga e colaboradores publicaram este ano que interação entre Gal-3 e glicanos só ocorrem em condições apropriadas. Isso embasa ainda mais a possibilidade da existência de uma concentração ótima para o uso dos polissacarídeos sulfatados, como descrevemos a cima.

Podemos levantar também a hipótese de que a galectina-3 não esteja funcional já que o controle positivo migrou de forma semelhante ao controle negativo. Para testar a sua atividade, o ensaio mais indicado é o de hemaglutinação (Talaga *et al.*2016) para verificar se a galectina-3 realmente está se ligando aos nossos compostos. Este ensaio consiste em fazer uma solução utilizando a galectina e os nossos polissacarídeos por um tempo determinado e depois esta solução é tratada com lactose com a finalidade de observar se a ligação ocorrida é dependente de glicano. Assim, conseguiríamos verificar se os nossos compostos conseguem interagir e se ligar a Gal-3.

Com a finalidade de verificar uma outra via de inibição de lectinas realizamos o ensaio de peritonite aguda. Nesse experimento utilizamos, inicialmente, apenas a galactana do *Echinometra lucunter* e observamos que o tratamento levou a uma diminuição do infiltrado inflamatório (**figura 13**).

O trabalho de Talaga já citado a cima também mostra a interação da galectina-3 com GAGs sulfatados e proteoglicanos. Eles demonstraram que quando ocorre uma modificação nesses compostos a galectina deixa de se ligar. Utilizando o experimento de calorimetria eles conseguiram definir que a ligação entre o GAG e a Gal3 ocorre na região CRD da lectina.

Diante destes resultados, algumas considerações podem ser realizadas. Primeiro, como uma perspectiva, precisamos realizar um teste de toxicidade das galactanas. Precisamos saber em quais doses esses compostos são tóxicos tanto *in vivo* como *in vitro*. Verificar se o ensaio de migração em *transwell* é a melhor forma de responder a nossa pergunta inicial e, em caso positivo, como podemos melhorar o mesmo. Um importante experimento a ser realizado seria testar a ação das galactanas sulfatadas no ensaio de invasão em *transwell*. Este ensaio é um pouco diferente do convencional visto que se faz necessário a utilização de matrigel no inserto, onde este iria mimetizar uma matriz extracelular em que as células precisariam degradar para poderem migrar. As condições a serem utilizadas seriam as mesmas de um *transwell* convencional. Por último, precisamos realizar o experimento de peritonite aguda com a galactana da *Styela plicata*.

Como podemos observar, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas e muitos experimentos a serem realizados. Por isso nosso laboratório vem desenvolvendo algumas técnicas para expressar a galectina-3 em bactérias, com a finalidade de não ficarmos tão dependentes da compra desta lectina. Esse trabalho já está bem avançado necessitando apenas da purificação em coluna de lactose. Depois que ela estiver purificada pretendemos realizar um ensaio de calorimetria onde iremos verificar sua interação com GAGs, obtendo assim uma visão mais real de como a galectina-3 age e quais são as condições ideais para seu uso.

Assim pretendemos entender e responder algumas perguntas sobre a galectina-3 e encontrar funções biológicas dos polissacarídeos sulfatados que trabalhamos em nosso laboratório.

7. CONCLUSÃO

Utilizamos duas galactanas sulfatadas que se diferem estruturalmente e testamos as duas quanto à interação com galectina-3 em um modelo de migração celular, porém os resultados mostrados neste trabalho sugerem que existe uma concentração ótima para a utilização destes compostos.

O modelo de peritonite aguda mostrou resultados positivos no tratamento com a galactana sulfatada do *Echinometra lucunter*, demonstrando que mesmo que esse composto não tenha resultados na migração celular, ele pode ser utilizado como componente anti-inflamatório e potencialmente anti-metastático.

Ainda existem muitos ajustes a serem realizados na linha experimental, mas os resultados obtidos foram satisfatórios mesmo não sendo o que esperávamos. Vamos desenhar novamente os experimentos e repeti-los para confirmar todos os resultados aqui demonstrados.

8. REFERÊNCIAS

- ABC do câncer: 2012. **Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_abc_2ed.pdf
- ALVES, A. P. *et al.* Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. **The Journal of Biological Chemistry** v. 272, n. 11, p. 6965–6971, 14 mar. 1997.
- Balmain, A., Barrett, J.C., Moses, H., e Renan, M.J. (1993). **How many mutations are required for tumorigenesis? implications from human cancer data**. *Mol. Carcinog.* 7, 139–146
- BAPTISTE, Trevor A. *et al.* Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: implications in the extracellular functions of the lectin. **Experimental Cell Research** v. 313, n. 4, p. 652–664, 15 fev. 2007
- Belizário E.J (2002) **O próximo desafio: Reverter o câncer**. eds (São Paulo Instituto de ciências biomédicas), PP. 52-57
- Carlos, T. M.; Harlan, J.M (1994) . **Leukocyte-endothelial adhesion molecules**. **Blood**, v.84, p. 2068-210.
- Carvalho, R. S. *et al.* (2014) **Characterization of LGALS3(galectin-3) as a player in DNA damage response**. *Cancer Biology e Therapy*, v. 15, n7, p.840-850, 1 jul.
- CASTRONOVO, V. *et al.* Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. **The Journal of Pathology** v. 179, n. 1, p. 43–48, maio 1996.
- CORVELHO, C. M. **Predisposição genética ao câncer**. Disponível em: http://www.fleury.com.br/medico/saude_da_mulher.
- Cronstein, B. N.; Weissman, G (1993). **The adhesion molecules of inflammation**. **Arthritis Rheum.**, v. 136, p. 147-157,
- Crowther M.A. Ginsberg J.S., Tollefsen D.M.,
- CUMASHI, Albana *et al.* A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology** v. 17, n. 5, p. 541–552, maio 2007.
- DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annual Review of Cell Biology** v. 9, p. 237–264, 1993.
- Fei, F. *et al.* (2015). **B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3**. *Oncotarget*, v. 6, n 13, p. 11378,.
- FORTUNA-COSTA, Anneliese *et al.* Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. **Frontiers in Oncology** v. 4, p. 138, 2014.
- Foulds, L. (1954). **The Experimental Study of Tumor Progression: A Review**. *Cancer Res.* 14, 327–339.
- GERLACH, Dieter *et al.* N-acetyl-D-galactosamine/N-acetyl-D-glucosamine--recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **FEMS immunology and medical microbiology** v. 43, n. 2, p. 223–232, 1 fev. 2005.

Goldstein, I. J. et al (1983). **Chemical taxonomy molecular biology and function of plant lectin.**, New York: R. Liss Incorp, p.225-36,

Gomes, A. M. et al.(2000), **Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin analog from the mollusk *Nodipecten nodosus*: Effect on P-selectin, heparanase, metastasis and cellular recruitment.** *Glycobiology*, v.25, n.4, p. 306-312, mar)

Hait, W.N.(2010) **Anticancer drug development: the grand challenges.** *Nature Reviews. Drug Discovery*, v.9, n. 4,p.253-254,abr.

HILGERT, I. *et al.* Adult transplantation tolerance induced by lentil lectin. III. Induction of transplantation tolerance by lentil lectin in mouse strain combinations with different H-2 disparities: tolerogenic effect of H-2D region antigens. **Journal of Immunogenetics** v. 10, n. 2, p. 127–137 , abr. 1983.

HIRSH, J. *et al.* Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. **Chest** v. 114, n. 5 Suppl, p. 489S–510S , nov. 1998.

HOLÍKOVÁ, Zuzana *et al.* Defining the glyco phenotype of squamous epithelia using plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of alpha2,6- and alpha2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas, and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica** v. 110, n. 12, p. 845–856 , dez. 2002.

Huttenlocher, A.; Sandborg, R.R.; Horwitz, A. F.(1995) **Adhesion in cell migration.** *Curr. Opin Cell Biol.*, v.7, p. 697-706,
Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). **Lessons from Hereditary Colorectal Cancer.** *Cell* 87, 159–170.

IDIKIO, H. Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade. **International Journal of Oncology** v. 12, n. 6, p. 1287–1290 , jun. 1998.

JIN, Long *et al.* Galectin-3 Expression in Functioning and Silent ACTH-Producing Adenomas. **Endocrine Pathology** v. 16, n. 2, p. 107–114 , 2005.

KILPATRICK, David C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica Et Biophysica Acta** v. 1572, n. 2–3, p. 187–197 , 19 set. 2002.

KOO, Ja Seung; JUNG, Woohee. Clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of triple negative invasive lobular carcinoma. **Yonsei Medical Journal** v. 52, n. 1, p. 89–97 , jan. 2011.

KOYANAGI, Satoru *et al.* A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. **Cancer Research** v. 63, n. 21, p. 7277–7283 , 1 nov. 2003.

KYSELOVA, Zuzana *et al.* Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. **Journal of Proteome Research** v. 6, n. 5, p. 1822–1832 , maio 2007.

LIS, H.; SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry** v. 42, n. 0, p. 541–574 , 1973.

LIU, Fu-Tong; RABINOVICH, Gabriel A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews. Cancer** v. 5, n. 1, p. 29–41 , jan. 2005.

- LOGULLO, Angela F. *et al.* C-erbB-2 expression is a better predictor for survival than galectin-3 or p53 in early-stage breast cancer. **Oncology Reports** v. 18, n. 1, p. 121–126 , jul. 2007.
- LORIS, Remy. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica Et Biophysica Acta** v. 1572, n. 2–3, p. 198–208 , 19 set. 2002.
- Marques, M. R.F.; Barracco, M.A (2000) **Lectins , as non-self-recognition factors, in crustaceans.** *Aquaculture*, v. 191, n. 1-3, p. 23-44
- Mcever, R.P.(1991). **Leukocyte interactions mediated by selectins.** *Thromb. Haemost.*, v.66, p. 80-87
- Mehul, B.; Hughes, R. C (1997.) **Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin-3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion.** *Journal of cell science*, v. 110 (Pt 10), p. 1169-1178, maio
- Menon, R. P.; Hughes, R.C (1999) Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *European journal of biochemistry/ FEBS*, v.264,n 2,p 569-576, set.
- MOUTSATSOS, I. K. *et al.* Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 84, n. 18, p. 6452–6456 , set. 1987.
- MUNKLEY, Jennifer *et al.* Glycosylation is an Androgen-Regulated Process Essential for Prostate Cancer Cell Viability. **EBioMedicine** v. 8, p. 103–116 , jun. 2016.
- Nader HB, Pinhal MA, Baú EC, Castro RA, Medeiros GF, Chavante SF, Leite EI, Trindade ES, Shinjo SK, Rocha HA, Tersariol IL, Mendes A, Dietrich CP (2001), **Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endotelial cells .** *Braz J Med Biol Res*: 699-709
- NANGIA-MAKKER, P. *et al.* Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **The American Journal of Pathology** v. 156, n. 3, p. 899–909 , mar. 2000.
- NEWLACZYL, Anna U.; YU, Lu-Gang. Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer. **Cancer Letters** v. 313, n. 2, p. 123–128 , 27 dez. 2011.
- NI, Y.; TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 55, n. 1–3, p. 205–223 , dez. 1996.
- OCHIENG, Josiah; FURTAK, Vyacheslav; LUKYANOV, Pavel. Extracellular functions of galectin-3. **Glycoconjugate Journal** v. 19, n. 7–9, p. 527–535 , 2004.
- O'DRISCOLL, Lorraine *et al.* Lack of prognostic significance of survivin, survivin-deltaEx3, survivin-2B, galectin-3, bag-1, bax-alpha and MRP-1 mRNAs in breast cancer. **Cancer Letters** v. 201, n. 2, p. 225–236 , 25 nov. 2003.
- PARON, Igor *et al.* Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 302, n. 3, p. 545–553 , 14 mar. 2003.
- Petri, B.; Bixel, M.G (2006). **Molecular events during leukocyte diapedesis.** *Febs J.*v. 273, p. 4399-07.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** v. 33, n. 3, p. 209–258, 1998.

Pomim, V.H e Mourão, Paulo A.S (2006) **Carboidratos: De adoçantes a medicamentos**. PP.25-30

POMIN, Vitor H. Fucanomics and galactanomics: current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. **Biochimica Et Biophysica Acta** v. 1820, n. 12, p. 1971–1979, dez. 2012.

Prasad, V.V.; Gopalan, R.O (2010). **Continued use of MDA-MB-435, a melanoma cell line, as a model for human breast cancer, even in year, 2014**. *Npj Breast Cancer*, v.2, n.11, p. a003244, Nov.

PROUDFOOT, A. E. I. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. **Biochemical Society Transactions** v. 34, n. Pt 3, p. 422–426, jun. 2006.

PUNT, Simone *et al.* Galectin-1, -3 and -9 Expression and Clinical Significance in Squamous Cervical Cancer. **PloS One** v. 10, n. 6, p. e0129119, 2015.

RABINOVICH, Gabriel A. *et al.* Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends in Immunology** v. 23, n. 6, p. 313–320, jun. 2002.

Rabinovich, G.A.; Toscano, M.A (2009). **Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation**. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 5, p.338-352, maio
Rankin, J.A (2004). **Biological mediators of acute inflammation**. *AACN clin. Issues.*, v. 15, p. 3-17.

RAMOS, M. V. *et al.* Characterization of the sugar-binding specificity of the toxic lectins isolated from *Abrus pulchellus* seeds. **Glycoconjugate Journal** v. 18, n. 5, p. 391–400, maio 2001.

ROTHSCHILD, Null. The metabolism of fertilized and unfertilized sea-urchin eggs; the action of light and carbon monoxide. **The Journal of Experimental Biology** v. 26, n. 1, p. 100–111, maio 1949.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **Advances in Experimental Medicine and Biology** v. 491, p. 1–16, 2001.

SHIBUYA, N. *et al.* Carbohydrate binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 249, n. 1, p. 215–224, 15 ago. 1986.

Smith, C.W (2008) **Adhesion molecules and receptors**. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.121, p.375-9.

Tedgui, M.; Mallat, Z. **Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall**. *Circul. Res.*, v.88, p. 877-887, 2001.

Valastyan, S; Weinberg, R.A (2011). **Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms**. *Cell* 147, 275–292,

VAN DAMME, E. J. *et al.* The seed lectins of black locust (*Robinia pseudoacacia*) are encoded by two genes which differ from the bark lectin genes. **Plant Molecular Biology** v. 29, n. 6, p. 1197–1210, dez. 1995.

VILELA-SILVA, Ana-Cristina E. S.; HIROHASHI, Noritaka; MOURÃO, Paulo A. S. The structure of sulfated polysaccharides ensures a carbohydrate-based mechanism for species recognition during sea urchin fertilization. **The International Journal of Developmental Biology** v. 52, n. 5–6, p. 551–559, 2008.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review of Biochemistry** v. 65, p. 441–473, 1996.

Yang, R.; Yosshino, T. P.(1990). **Immunorecognition in the Fresh-Water Bivalve, *Corbicula-Fluminea*. 2 Isolation and Characterization of a plasma Opsonin with Hemagglutinating activity.** *Developmental and comparative immunology*, v.14, n.4, p 397-404

YU, G. *et al.* Heparinase I acts on a synthetic heparin pentasaccharide corresponding to the antithrombin III binding site. **Thrombosis Research** v. 100, n. 6, p. 549–556 , 15 dez. 2000.